

诱导大鳍鳠和长吻𬶏排卵过程中血清 GTH 水平的变化

王德寿¹ 林浩然²

(1. 西南师范大学生命科学学院,重庆 400715;2. 中山大学生命科学学院,广州 510275)

摘要: 繁殖期从嘉陵江收集性成熟的大鳍鳠和长吻𬶏野生亲鱼,用 Linpe 方法(即 LHRH-A 加多巴胺 D₂ 受体拮抗剂地欧酮)或传统的 LHRH-A 加脑垂体的方法进行催产,定时取血样,用放射免疫方法测定催产过程中血清 GTH 水平的变化,进一步证实鲇形目鱼类 GTH 的分泌受到下丘脑分泌的促性腺激素释放激素 GnRH 和多巴胺的双重调节;排卵和产卵也是以血清 GTH 的急剧升高为先导的,而最终能否排卵还有赖于血清 GTH 峰是否超过“排卵阈值”。尽管催产后的大鳍鳠和长吻𬶏雄鱼血清 GTH 水平也有一个高峰出现,但血清 GTH 水平升高幅度都大大低于雌鱼,这种现象在硬骨鱼类可能具有普遍性。

关键词: 大鳍鳠和长吻𬶏;诱导排卵;血清 GTH 水平;性别差异

中图分类号:S965.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2001)02-0185-06

我国学者对淡水鱼类生殖生理的研究,特别是催产试验及其有关的生殖内分泌研究,基本上是围绕鲤形目、主要是鲤科鱼类进行的。近年来,鲇形目鱼类的养殖得到飞速发展,一方面,引进的品种不断增加,另一方面,对我国特产经济鲇鱼的蓄养驯化也取得可喜成绩,成功地实现了南方鲇(*Silurus meridionalis* Chen)、长吻𬶏(*Leiocassis longirostris* Gunther)、大鳍鳠[*Mystus macropterus* Bleeker]等一些重要经济鲇类的人工繁殖,养殖技术也日益成熟。随着养殖面积的不断增加,其苗种供不应求的矛盾日益突出,鱼类生殖内分泌研究是提出完善的人工繁殖技术措施和解决苗种问题的前提。因此,本研究以鲇形目鲿科的大鳍鳠和长吻𬶏为试验对象,研究了在催产过程中血清 GTH 水平的变化规律。

1 材料和方法

1.1 实验动物 大鳍鳠和长吻𬶏均采集于长江的支流嘉陵江下游合川至重庆江段的船上。在2×1.5×0.8m的小水池中经2d—7d的暂养后再进行实验。实验鱼的暂养、

收稿日期:1999-04-16;修订日期:2000-03-20

基金项目:重庆市应用基础研究项目

作者简介:王德寿(1964—),男,四川省广安市人;教授,博士;现在荷兰乌德勒支大学作访问学者,从事非洲鲇雄激素受体基因的克隆及其相关研究,荷兰乌德勒支大学实验动物系 Goos 教授提供非洲鲇 GTH 标准品和抗血清,特此致谢

药物注射和取样均在重庆北碚西南师范大学生命科学学院完成。实验鱼均进行了常规的生物学测量,并计算了成熟系数 GSI(性腺重×100%/体重)。大鳍鳠和长吻𬶏的体重分别为:72—323g 和 1.75—3.80kg。

1.2 大鳍鳠和长吻𬶏诱导排卵试验和取血时间 大鳍鳠诱导排卵试验是在 1995 年 6 月进行的,将收回的 28 尾雌鱼(GSI:16.05%—18.05%)和 28 尾雄鱼(GSI:0.55%—0.74%)各分成四个组,每组 7 尾。分别注射 LHRH-A+DOM, LHRH-A+Veh., PS+DOM 和 PS+Veh., PS 为鱼用生理盐水, Veh. 为 0.8% NaCl 和 0.1% Na₂S₂O₅ 载体溶液, 注射剂量为 LHRH-A 0.1μg/g B.W., DOM 10μg/g B.W., 注射后 6, 12, 24h 取血。长吻𬶏的诱导排卵试验是在 1995 年 5 月进行的,共选用性腺发育成熟的长吻𬶏雌鱼 13 尾(GSI:6.86%—9.87%)、雄鱼 5 尾(GSI:0.47%—1.01%)进行催产。雌鱼按每公斤体重两个白鲢脑垂体(SCPG)加 LHRH-A 30—45μg 注射, 雄鱼剂量减半。注射分两次进行,第一次注射总剂量的 1/3,第二次注入余下的 2/3。注射的时间间隔为 8—10h。取血时间为 0h(注射前)、8—10h(注射第二针前)、18—20h(第二针后约 10h)、28—30h(第二针后约 20h)、35—36h、48h。

1.3 样品处理和激素测定 取血采用 1mL 注射器从尾静脉进行, 血样在 4℃ 下静置数小时, 然后在 15000r/min 离心 3—5min, 取上清液保存于 -25℃ 以下的低温冰箱中, 液氮运输至中山大学鱼类室, 采用促性腺激素异源放射免疫测定方法^[1] 测定血清的 GTH 含量。

1.4 数据处理 实验所得数据经整理后均表述为 $\bar{X} \pm SEM$ 的形式, 用 Duncan's 新复极差检验法比较各实验组之间和不同取样时间的激素水平平均值的差异。当 $P < 0.05$ 时, 认为差异显著。

2 结果

2.1 大鳍鳠催产前后血清 GTH 水平的变化

注射 LHRH-A+DOM, LHRH-A+Veh., PS+DOM 和 PS+Veh. 催产后大鳍鳠雌鱼四个组的排卵鱼数分别为 5/7, 1/7, 0/7, 0/7 尾, 效应时间在 22h。

注射后 6h, 12h 和 24h 四个组的血清 GTH 水平见图 1。注射 DOM+PS 对血清 GTH 水平没有影响, 注射 LHRH-A+Veh., 使血清 GTH 水平显著升高, 而当 LHRH-A 与 DOM 结合注射时, 血清 GTH 水平显著高于注射 LHRH-A+Veh. 后的血清 GTH 水平, 反映出 DOM 对 GTH 释放的增强作用。血清 GTH 水平最高的一组, 也即 LHRH-A 与 DOM 结合注射组排卵鱼数也最多。

值得注意的是, 在性成熟期, 注射等剂量的 LHRH-A 和 LHRH-A+DOM 对雄鱼血清 GTH 水平的升高作用远不及雌鱼明显(图 1B)。

2.2 长吻𬶏催产前后血清 GTH 水平的变化

诱导长吻𬶏排卵过程中血清 GTH 水平的变化见图 2。注射 LHRH-A 和 鲢脑垂体悬液(SCPS)催产后, 13 尾雌鱼中有 7 尾在注射第二针后 18—20h 排卵, 排卵雌鱼的血清 GTH 峰明显高于未排卵雌鱼。此外, 注射 LHRH-A+SCPS 后, 5 尾雄鱼血清 GTH 水平上升的速度和幅度均较雌鱼低得多。

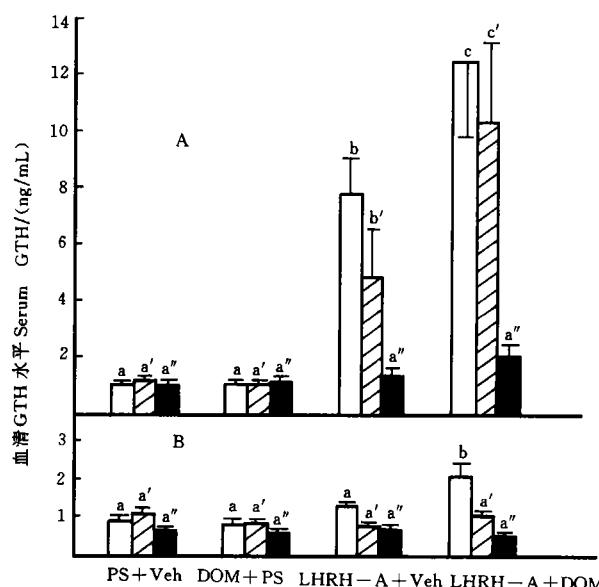


图 1 注射 LHRH-A(0.1 μ g/g B. W.)/DOM(10 μ g/g B. W.)对大鳍鳠催产过程中血清 GTH 水平的影响, 图中相同字母表示的血清 GTH 水平没有显著的差异。

Fig. 1 Effects of LHRH-A (0.1 μ g/g B. W.) alone and in combination with DOM (10 μ g/g B. W.) on serum GTH levels in the bagrid catfish *M. macropterus*. Values with the same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

A: 雌鱼:female B: 雄鱼:male □ 6h ▨ 12h ■ 24h

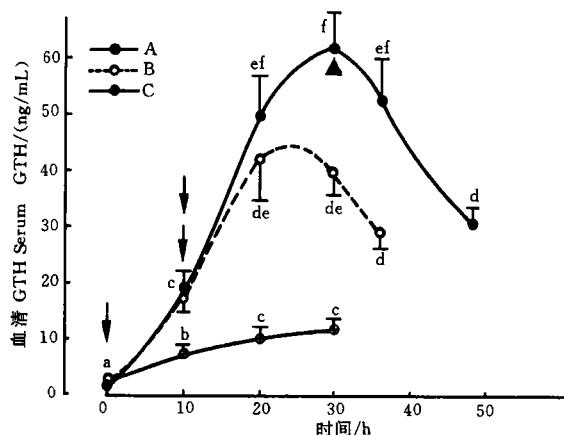


图 2 长吻𬶏催产前后血清 GTH 水平的变化

Fig. 2 Changes in the serum GTH levels during the induced ovulation of *L. longirostris* by exogenous hormone injection.

Dose: LHRH-A, 30—45 μ g/kg B. W.; Silver carp pituitary suspension (SCPS), 2SCPG/kg B. W.; The drugs and SCPS were given in two doses with an interval of 8—10h. For the first injection (↓) 1/3 total dose was used, and for the second injection (↓↓) the other 2/3 total dose. Ovulation (▲) was achieved at 18—20h for some females after the second injection. Values with the same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

A: 排卵雌鱼 female, ovulated B: 未排卵雌鱼 female, unovulated C: 雄鱼 male

↓ 第一次注射 ↓↓ 第二次注射 ▲ 排卵 图中相同字母表示的血清 GTH 水平没有显著的差异。

3 讨论

3.1 鲱类 GTH 分泌的神经内分泌调节

大量研究表明:在硬骨鱼类, GTH 的释放受到下丘脑分泌的促性腺激素释放激素(GnRH), 哺乳类 LHRH 及其高活性类似物的促进, 同时还受到下丘脑分泌的神经内分泌因子多巴胺(DA)等的抑制性调节。在鲇类, De Leeuw 等首先发现非洲鲇鱼 GTH 的分泌释放受到下丘脑分泌的 GnRH 和 DA 的双重调节^[2,3]。对蟾胡子鲇^[4]和印度鲇鱼^[5]诱导排卵试验结果和内分泌研究也得出了相同的结论。在大鳍鳠性成熟产卵期将 LHRH-A 单独注射能显著提高血清 GTH 水平;单独注射 DA 的拮抗剂 DOM 不能影响大鳍鳠血清 GTH 水平, 而当 DOM 与 LHRH-A 结合注射时却能显著增强 LHRH-A 促进血清 GTH 水平升高的作用, 反映出 LHRH-A 对 GTH 分泌的诱导作用和 DA 对 GTH 分泌的间接抑制作用。这与以前用卵黄发生后期的大鳍鳠雌鱼进行实验的结果是一致的^[1]。反映出鲇类 GTH 释放的神经内分泌调控机理具有共性。

3.2 排卵前血清 GTH 峰和“排卵阈值”

研究表明, 排卵前 GTH 的大量涌出(Preovulatory GTH Surge)是完成配子的最后成熟和排卵的先决条件, 因而排卵前血清 GTH 高峰在硬骨鱼类中普遍存在^[3,6-9]。姜仁良等认为:排卵前血液中 GTH 含量的急剧增加, 达到一定的阈值水平, 是促使鱼类排卵, 产卵必需具备的内在条件。但“排卵阈值”可能存在着种间差异, 同种鱼的排卵阈值也随着年龄, 个体大小和性腺发育程度而异^[6]。家鱼的“排卵阈值”一般为基础水平的 30—40 倍。团头鲂 17 倍(133.7/7.71)^[7]。非洲鲇鱼的“排卵阈值”为 80 倍(72.1/0.9)^[10]。大鳍鳠和长吻𬶏诱导排卵的过程中也观察到排卵前血清中 GTH 含量的急剧升高的现象, 并测得长吻𬶏的“排卵阈值”为基础水平的 45 倍(60.78/1.36)。由于未能在大鳍鳠排卵雌鱼血清 GTH 水平的高峰取样测定血清 GTH 含量, 故无法准确确定大鳍鳠的“排卵阈值”是多少, 但从排卵雌鱼在注射后 6h 和 12h 的血清 GTH 水平估计, 其“排卵阈值”应为基础水平的 30 倍左右。

注射等剂量的 LHRH-A + SCPS 后, 长吻𬶏排卵雌鱼的血清 GTH 峰明显高于未排卵雌鱼, 这反映出两者对药物的不同反应性, 说明只有当雌鱼性腺完全发育成熟后, 才具有最好的药物反应能力, 适时进行药物诱导才能使血清 GTH 水平达到排卵阈值, 从而实现排卵(或产卵)。

3.3 催产后血清 GTH 水平的性别差异

在本研究中发现, 催产后鲿科鱼类血清 GTH 水平有明显的性别差异:注射等剂量的 LHRH-A 和 LHRH-A + DOM 对大鳍鳠雄鱼血清 GTH 水平的升高作用远不及雌鱼明显;同样, 在诱导长吻𬶏排卵过程中, 注射 LHRH-A + SCPS 后, 雄鱼血清 GTH 水平上升的速度和幅度均明显低于雌鱼, 到排卵时, 两者的 GTH 水平要相差 5—6 倍。作者曾发现大鳍鳠脑垂体 GTH 的年平均含量有着极显著的性别差异, 雌鱼为 $2.62 \pm 0.19 \mu\text{g}/\text{mg}$, 而雄鱼为 $1.25 \pm 0.08 \mu\text{g}/\text{mg}$, 不及雌鱼的一半。统计检验发现雌雄鱼脑垂体 GTH 含量的差异主要是在繁殖季节 4—7 月。而周年中, 血清 GTH 水平没有性别差异^[11]。这意味着繁殖季节雌鱼脑垂体 GTH 含量的增加并不主要用于繁殖季节血清基础 GTH 水平升高,

而是为排卵前 GTH 的大量涌出作准备。

Grim 等^[12]在研究几种鲑科鱼类性成熟过程中血清 GTH 水平变化时也记录到排卵雌鱼与排精雄鱼 GTH 水平差异较大的情况,一般都相差 2—10 倍,差异最大的达 20 多倍。而在配子发生和卵黄积累阶段,这几种鲑科鱼类血清 GTH 水平几乎没有性别差异。同样的情况也在鲤鱼和金鱼中观察到^[9,13]。尽管雄鲤鱼和金鱼在排精时也表现出与雌鱼同步的血清 GTH 高峰,以保证排精和排卵的同步性,但雄鱼的峰比雌鱼低得多。在鲤鱼,约为雌鱼峰值的 1/24,而在金鱼约为雌鱼峰值的 1/3。在非洲鲇鱼繁殖期,雌鱼脑垂体的 GTH 含量明显高于雄鱼^[14],产卵期捕获的正在排精的雄鱼血清 GTH 水平(2.8ng/mL)虽也较排精前(0.5ng/mL)明显升高,但远没有雌鱼升高明显,不足雌鱼血清 GTH 水平(29.7ng/mL)的十分之一^[15]。看来,这种情况在硬骨鱼类中具有一定的普遍性。

自然产卵情况下和催产后性别间 GTH 水平的差异与它们不同的生殖对策是一致的,一般来说,雄鱼在生殖过程中占据主导地位,许多种类的雄鱼精巢中的精子都先于雌鱼成熟,以便雌鱼卵子一旦成熟,随时可进行受精。另外,在许多鱼类,除繁殖季节精巢中有成熟精子外,在其他时期,甚至冬季,也有成熟精子。这表明诱导雄鱼排精较诱导雌鱼排卵容易得多。

参考文献:

- [1] 王德寿. 大鳍鳠促性腺激素分泌调控的研究[J]. 动物学报, 1998, 44(3):322—328
- [2] De Leeuw R, et al. Pimozyde modulates the luteinizing hormone-releasing hormone effect on gonadotropin release in the African catfish, *Clarias lazera* [J]. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1985, 58:120—127
- [3] De Leeuw R, et al. The regulation of gonadotropin release by neurohormones and gonadal steroids in the African catfish, *Clarias gariepinus* [J]. *Aquaculture*, 1987, 63:43—58
- [4] Manickam P Joy K P. Induction of maturation and ovulation by pimozyde-LHRH analogue treatment and resulting high quality egg production in the Asian catfish, *Clarias batrachus* (L.) [J]. *Aquaculture*, 1989, 83:193—199
- [5] Tharakan B, Joy K P. Effects of mammalian gonadotropin-releasing hormone analogue, pimozyde, and the combination on plasma gonadotropin levels in different seasons and induction of ovulation in female catfish [J]. *J. Fish Biol.*, 1996, 48:623—632
- [6] 姜仁良. 草鱼、鲢鱼催产前后血液中促性腺激素含量的动态变化[J]. 水产学报, 1980, 4(2):129—133
- [7] 姜仁良. 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 17 β -雌二醇含量变动的研究[J]. 水产学报, 1986, 10(2):185—193
- [8] Aida K. A review of plasma hormone changes during ovulation in cyprinid fishes [J]. *Aquaculture*, 1988, 74:11—21
- [9] Kobayashi M, et al. Gonadotropin surge during spawning in male goldfish [J]. *Gen Comp. Endocrinol.*, 1986, 62:70—79
- [10] Richter C J J, et al. The effect of pimozyde-LHRH α and 17 α -hydroxyprogesterone on plasma steroid levels and ovulation in the African catfish, *Clarias gariepinus* [J]. *Aquaculture*, 1987, 63:157—168
- [11] 王德寿, 林浩然. 大鳍鳠脑垂体和血清促性腺激素(GTH)水平的季节变化[C]. 鱼类学论文集(第六辑), 北京: 科学出版社, 1997, 22—27
- [12] Crim L W, et al. The plasma gonadotropin profile during sexual maturation in variety of salmonid fishes [J]. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1975, 27:62—70
- [13] 林浩然, 等. 环境因素和促黄体素释放激素类似物 LHRH-A 对鲤促性腺激素分泌和排卵的影响[J]. 水生生物学报, 1988, 12(3):272—275

- [14] Peute J, et al. Pituitary gonadotropin content and ultrastructure of the gonadotrops in the African catfish, *Clarias gariepinus*, during the annual reproductive cycle in natural habitat [J]. *Can. J. Zool.*, 1986, **64**:1718—1726
- [15] Resink J W, et al. Quantitative enzyme histochemistry of steroid and glucuronide synthesis in testes and seminal vesicle, and its correlation to plasma gonadotropin level in *Clarias gariepinus* [J], *Aquaculture*, 1987, **63**:97—114

CHANGES IN SERUM GTH LEVELS DURING THE INDUCED OVULATION OF THE LARGE FIN LONG BARBEL CATFISH, *MYSTUS MACROPTERUS* AND *LEIOCASSIS LONGIROSTRIS*

WANG De-shou¹ and LIN Hao-ran²

(1. Department of Biology, Southwest China Normal University, Chongqing, 400715)

(2. Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract: *Mystus macropterus* (Bleeker) and *Leiocassis longirostris* Gunther were collected from the Jialing River, a tributary of the Yangtze River, during their spawning season. The homologous radioimmunoassay (RIA) for African catfish, *Clarias gariepinus*, gonadotropin was used to determine the serum GTH levels of these two fishes during the induced ovulation by injecting luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRH-A) plus domperidone (DOM), D₂ receptor antagonist of dopamine (DA) for *M. macropterus* and by injecting LHRH-A plus silver carp pituitary suspension (SCPS) for *L. longirostris*.

Like most teleosts, the gonadotropin release of these two fishes was under the dual regulation of gonadotropin-releasing-hormone (GnRH) and DA from the hypothalamus. In *M. macropterus*, LHRH-A alone stimulated GTH secretion, and DOM potentiated this effect of LHRH-A. Whereas DOM alone had no effect on basal GTH secretion of the fish.

A preovulatory GTH surge was found prior to the ovulation of these two fishes. Ovulation cannot be successfully induced unless the preovulatory serum GTH peak could surpass a threshold. The induced serum GTH peak for males were much lower than that for females, although male's serum GTH level also elevated rapidly before spermiation. Similar cases were found in some other teleosts, both in natural and induced spawning condition.

Key words: *Mystus macropterus*; *Leiocassis longirostris*; Induced ovulation; Serum GTH changes; Sexual differences