

注射 LHRHa 对泥鳅血清性类固醇激素变化研究

覃志彪¹ 冯 健¹ 孙 挺² 何 志² 罗 波¹ 庞 卫¹

(1. 广西大学水产研究所, 南宁 530004; 2. 四川农业大学动物科技学院, 雅安 625014)

摘要:研究了注射促黄体激素类似物 (LHRHa) 后, 泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 血清性类固醇激素的变化规律, 并探讨在泥鳅繁殖季节时, 孕酮 (P)、睾酮 (T) 和雌二醇 (E_2) 对性腺发育的作用及调节机制。实验共分两组, 对照组和实验组; 对照组只注射生理盐水; 实验组注射 LHRHa, 雌鱼 0.2 $\mu\text{g/g}$, 雄鱼减半。注射前尾静脉采血, 作为血液样本分析基础水平 (0h), 注射药物后分别在 7、24、48、72 和 96h 尾静脉采血。测定雌鱼睾酮、雌二醇和孕酮, 雄鱼孕酮和睾酮血清浓度。实验结果表明: 注射 LHRHa, 雌鱼血清睾酮和雌二醇浓度显著高于对照组, 雄鱼血清睾酮和孕酮显著高于对照组 ($P < 0.05$); 24h 浓度较高, 雌鱼孕酮、睾酮和雌二醇分别为 (0.710 $\pm$ 0.082) ng/mL、(9.00 $\pm$ 0.57) ng/mL 和 (696.4 $\pm$ 6.2) pg/mL, 雄鱼孕酮和睾酮分别为 (0.527 $\pm$ 0.121) ng/mL 和 (9.62 $\pm$ 0.62) ng/mL。实验组雌鱼孕酮变化基本规律为: 基础水平 (0—7h) - 逐渐升至最高 (7—24h) - 逐渐降至基础水平 (24—48h) - 维持基础水平 (48—96h)。实验组雌鱼睾酮和雌二醇与雄鱼孕酮和睾酮变化规律基本相似, 其规律为: 逐渐上升至最高 (0—24h) - 逐渐降至基础水平 (24—72h) - 维持基础水平 (72—96h)。24h 对照组雌鱼睾酮和雌二醇显著升高, 浓度分别为: 睾酮 (2.20 $\pm$ 0.18) ng/mL, 雌二醇 (269.1 $\pm$ 36.6) pg/mL。对照组雄鱼血清孕酮和睾酮浓度实验期间均无显著变化。研究认为: LHRHa 能够刺激泥鳅性类固醇激素分泌, 特别是睾酮的分泌, 显著提高雌鱼性腺指数 (GSI)。但刺激 P 的分泌调控能力有限, 实验期间处于较低水平, 诱导排卵效果差, 泥鳅的性类固醇激素可能有特殊的调节机制。雌二醇和睾酮对性腺成熟有重要作用, 孕酮对介导卵细胞最终成熟和排卵可能起重要作用, 而雌二醇和睾酮无明显效果。

关键词: 泥鳅; 促黄体激素类似物; 睾酮; 孕酮; 雌二醇

中图分类号: Q175 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)06-1168-07

性类固醇激素在血液中浓度变化在团头鲂 (*Megalobrama amblycephala* Yih) 和斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 等很多种鱼上已有研究^[1,2]。催产激素对促性腺激素、性类固醇激素或性腺发育的影响在黄鳝 (*Monopterus albus*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、七带石斑鱼 (*Epinephelus septemfasciatus*) 和大西洋鲑 (*Salmo salar*) 等很多鱼中亦有报道^[3-6]。但注射催产激素引起鱼类血清中性类固醇激素浓度变化规律及其作用和调节机制少有报道。

人工合成的促黄体激素释放激素类似物 (LHRHa) 已被广泛使用和证明能刺激很多硬骨鱼类促性腺激素的分泌。而性类固醇激素在促性腺激素诱导卵母细胞成熟和排卵过程中起中介作用^[7]。不同的鱼类对 LHRHa 的反映敏感性有较大的差异,

Crim, et al. 认为, 鲑科鱼类对 LHRHa 的敏感性比鲤科鱼类低。泥鳅、黄鳝和石斑鱼都有自然性反转现象^[8], 人工催产实验表明, 它们对 LHRHa 的敏感性低于鲤科鱼类^[9,10]。LHRHa 诱导泥鳅排卵效果较差, 需要的剂量明显大于鲤科鱼类, 效应时间也较鲤科鱼类长。这类鱼性类固醇分泌调节机制有何特殊之处, 尚需进一步研究。

本实验使用 LHRHa 对泥鳅催产期间血清中的 P、T 和 E_2 含量变化规律进行研究, 探讨引起雌泥鳅排卵和雄泥鳅鱼排精之间的关系, 及 P、T 和 E_2 对性腺发育的作用和调节机制。为丰富有自然性反转鱼类性类固醇激素分泌的调节机制研究基础资料和某些性类固醇激素类似物对泥鳅等有自然性反转的鱼类催产繁殖增效的可能性提供理论依据。

收稿日期: 2008-02-25; 修订日期: 2009-01-06

基金项目: 广西科技厅计划项目 (0815006-1-3) 资助

作者简介: 覃志彪, 男, 汉族, 讲师; 主要从事鱼类生物学研究

通讯作者: 冯健, 男, 汉族, 教授, 德国慕尼黑大学动物生理学博士 (VMD); E-mail: fengjian08@163.com

1 材料与方法

1.1 实验设计和样品采集 实验泥鳅 2007年 6月购于四川省雅安市雨城区农贸水产市场。选择个体均匀,无伤无病,雌鳅要求腹部圆大,生殖孔红润,雄鳅要轻压腹部有乳白色精液流出,剔除不符合要求的。实验结束后解剖观察,测量体长,称体重 (g)和性腺重 (g),计算性腺成熟指数 (GSI) $GSI = \text{性腺重} / \text{体重} \times 100\%$ 。雌鱼体长 (13.68 ± 0.49) cm,雄鱼体长 (11.63 ± 0.67) cm;雌雄鱼 GSI分别为 (13.69 ± 1.95) %和 (0.55 ± 0.11) %。暂养于水族箱中。

泥鳅暂养 3d后进行实验,试验期为 6d。实验在室内水族箱中进行,每个组平均放入两个水族箱,两个组共四个水族箱。期间测得水温 22—24℃,溶氧 8.17 ± 2.15, pH 7.19 ± 0.34,氨氮 (7.95 ± 0.85) μmg/L,总硬度 (2.35 ± 0.09) mmol/L,亚硝酸盐 (2.18 ± 0.05) μmg/L。

药物注射前约 20min随即选择雄鱼和雌鱼各 3尾,尾静脉采血,以备测定,作为实验中血液样本分析的基础水平点 (0h)。余下的泥鳅随机分成两组,每组 50尾,雌雄各半;一组为实验组,一组为对照组。实验组注射 LHRHa,雌泥鳅按 0.2 μg/g体重剂量^[13],雄泥鳅减半;对照组仅注射生理盐水。使用 1 mL注射器,5号针头,一次性肌肉注射。注射后每天记录排卵鱼尾数,排卵率 = 排卵鱼数 / 实验鱼尾数 × 100%。注射后 7、24、48、72和 96h,将泥鳅放入 3-磺化甲烷麻醉液中 (100 mg/L),然后从尾静脉采取血液,血样静置 10min, 3000 r/min离心 15min,取血清速冻, - 28℃低温保存。

1.2 样品测定和分析 催产激素使用宁波市激素二厂生产的 LHRHa。采用直接化学发光免疫法测定血清雌 P、T和 E₂ 浓度,使用 Bayer Healthcare公司全自动免疫分析仪, V A 试剂盒由上海内分泌试剂厂生产。测定样本 E₂ 26个, P 66个, T 66个,共计 158个。

实验数据处理使用 SPSS13.0。确定各个试验组之间血清性类固醇含量的显著性差异,先进行方差齐性分析,运用 LSD 法进行单因素方差多重比较;试验组和对照组差异程度采用 t检验比较。显著水平采用 0.05,极显著水平采用 0.01。

2 结果

2.1 诱导泥鳅排卵期间排卵率、血清中孕酮 (P) 浓度变化

注射后观察表明,对照组泥鳅无排卵现象,排卵

率为 0%;实验组雌泥鳅有 10尾排卵,排卵率为 40%。LHRHa诱导泥鳅排卵期间,血清 P 浓度变化 (图 1、2)。结果表明,实验组 7h雌鱼血清 P 浓度 (0.193 ± 0.031) ng/mL 与 0h (0.190 ± 0.047) ng/mL 无显著差异 ($P < 0.05$)。随后逐渐上升,24h 升至 (0.710 ± 0.082) ng/mL, 极显著高于 0h 水平 ($P < 0.01$); P 浓度随后下降,约 48h 降至基础水平,浓度为 (0.213 ± 0.025) ng/mL,直到实验结束没有明显变化。对照组雌鱼 P 24h 和 48h 浓度分别为 (0.297 ± 0.055) ng/mL 和 (0.297 ± 0.025) ng/mL,显著高于 0h 水平 ($P < 0.05$)。

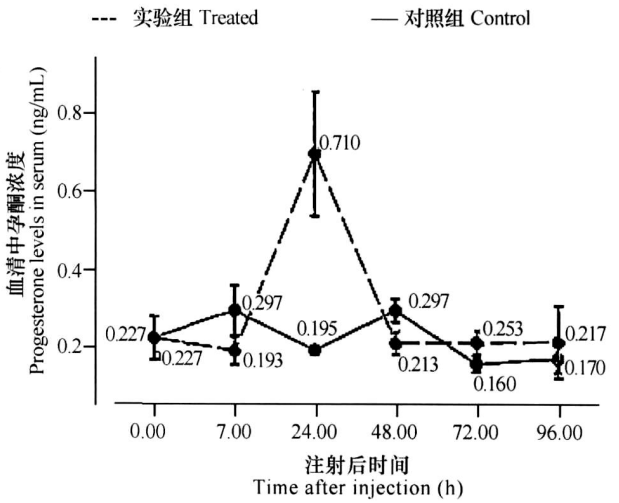


图 1 注射 LHRHa 后雌泥鳅血清 P 浓度变化

Fig. 1 Changes of progesterone (P) levels in serum during spawning induced with LHRHa in female loach

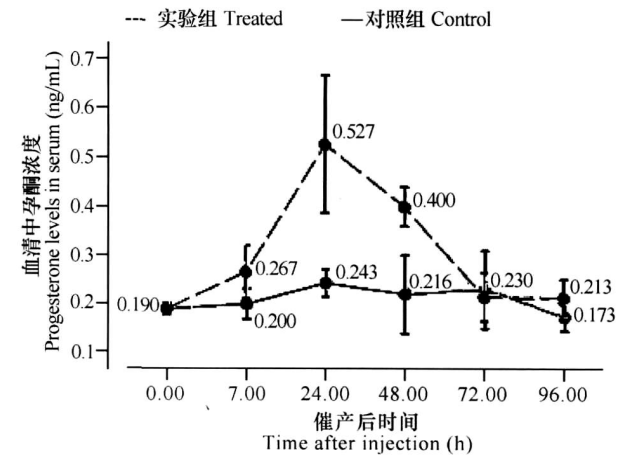


图 2 注射 LHRHa 后雄泥鳅血清 P 浓度变化

Fig. 2 Changes of progesterone (P) levels in serum during spawning induced with LHRHa in male loach

雄鱼注射 LHRHa 后, 24h 上升至 (0.527 ± 0.121) ng/mL, 差异显著 ($P < 0.05$); 随后逐渐下

降, 72h下降至 (0.215 ± 0.055) ng/mL,与 0和 96h无显著差异。对照组雄鱼在实验期间 P浓度无明显变化。

t检验表明,血清 P浓度,实验组雌鱼与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。而雄鱼实验组显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

2.2 诱导泥鳅排卵期间血清中睾酮 (T)浓度变化

LHRHa诱导泥鳅排卵期间,血清 T浓度变化(图 3、4)。结果表明,试验组雄泥鳅 7h血清 T浓度为 (3.86 ± 0.14) ng/mL,显著高于 0h T浓度 (0.63 ± 0.10) ng/mL ($P < 0.05$); 24h升至 (9.62 ± 0.62) ng/mL,极显著高于 0h ($P < 0.01$); 48h T浓度下降为 (7.16 ± 0.46) ng/mL,但仍然显著高于 0h ($P < 0.05$); T继续下降,72h T与 0h和 96h无显著差异。对照组雄泥鳅, T浓度在实验期间无明显变化。

雌泥鳅 T变化与雄泥鳅相似,试验组雌泥鳅 0h、7h、24h、48h和 96h血清 T浓度依次为 (0.73 ± 0.10) 、 (3.70 ± 0.16) 、 (9.00 ± 0.57) 、 (5.85 ± 0.41) 、 (1.52 ± 0.11) 和 (1.61 ± 0.42) ng/mL, 24h极显著高于其他各时间点 ($P < 0.01$); 其次是 48h和 7h,与其他各时间点差异显著 ($P < 0.05$); 最低的是 0和 96h。实验期间,对照组泥鳅仅在 24h T显著升高,浓度为 (2.20 ± 0.18) ng/mL。

不论是雄还是雌泥鳅, t检验表明,实验组血清 T浓度都显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

2.3 诱导泥鳅排卵期间血清中雌二醇 (E₂)浓度变化

LHRHa诱导泥鳅排卵期间,血清 E₂浓度变化(图 5)。结果表明,试验组雌泥鳅 7h E₂浓度为 (272.4 ± 4.2) pg/mL,较 0h (87.7 ± 3.5) pg/mL显著升高 ($P < 0.05$); 24h E₂达 (696.4 ± 26.2) pg/mL,极显著高于 0h水平 ($P < 0.01$); 48h降至 (442.1 ± 26.7) pg/mL,但仍显著高于 0h水平 ($P < 0.05$); 72h降至 (101.0 ± 2.3) pg/mL,与 0和 96h无显著差异 ($P < 0.05$)。实验期间,对照组雌泥鳅 24h E₂浓度为 (269.1 ± 36.6) pg/mL,显著高于 0、7、48、72和 92h E₂浓度 ($P < 0.05$)。t检验表明,实验期间,实验组 E₂显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

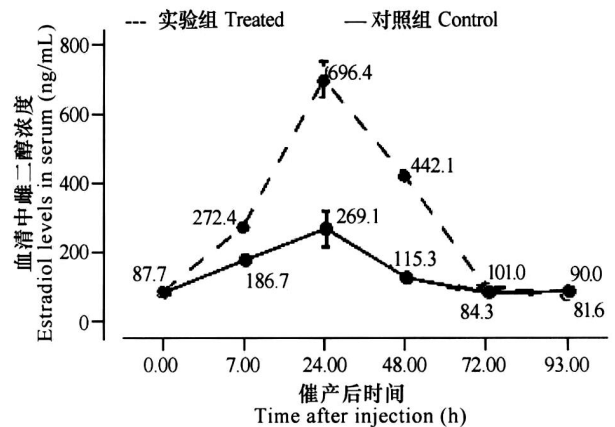


图 5 注射 LHRHa后雌泥鳅血清 E₂ 浓度变化

Fig. 5 Changes of estradiol (E₂) levels in serum during spawning induced with LHRHa in female loach

3 讨 论

3.1 睾酮的作用

试验结果显示,试验组雌泥鳅 T含量于注射 7、24和 48h后显著升高 ($P < 0.05$); 对照组雌泥鳅 T含量于注射 7、24和 48h后亦有不同程度升高,但仅

24h显著 ($P < 0.05$); 72h对照组和实验组都降到基础水平。虽然 T浓度上升阶段, 实验组极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 但变化趋势相似 (图 4)。t检验表明, 实验组中 T浓度显著高于对照组 ($P < 0.05$); 实验组较对照组 GSI有显著提高 ($P < 0.05$), T和 E_2 变化几乎同步, 且在 7—72h期间保持较高水平。实验结果表明: 雌泥鳅在一段时间内血清 T浓度有明显升高趋势, 注射 LHRHa能显著提高 T浓度, 说明 T能促进卵巢发育。鱼类众多研究表明, T与性腺指数 (GSI)变化一致, T有促进对卵巢发育作用^[1,11], 这与本实验分析结果一致。许多研究表明, 内源性 T对卵黄生成或介导卵黄在卵巢中的沉积起作用^[9, 12, 13]; 鳊的辜酮埋植实验表明, 外源性辜酮亦能促使肝细胞合成的卵黄蛋白原通过血液迅速地运送到卵巢, 并渗入卵母细胞内。T诱导的成熟和信号可被雄激素受体 (AR)的拮抗剂减弱, 因此雄激素信号可能被典型的 AR介导, 这一信号途径可能是雄激素作用的主要途径, 甚至也对体外 P介导的成熟起作用^[12]。上述表明, T能促进卵细胞成熟, 可能是因加速了卵黄蛋白从血液向卵巢转移和在卵细胞中沉积。

一些研究结果还表明, LHRHa能够有效的刺激雌鱼辜酮分泌, 且在 7—48h维持较高水平。对花尾胡椒鲷 (*Plectorhynchus cinctus*)注射 LHRHa实验表明, 能够显著升高血清 T浓度, 并且维持较长时间^[14], 这与本实验结果一致。但对牙鲆 (*Paralichthys olivaceous*)研究表明, 注射 LHRHa, 6h后血清 T浓度急剧下降, 12h降到最低, 以后逐渐回升^[15]。这与本实验结果不同, 可能是因鱼种类和注射时期不同。本实验中虽然 T在较长时间内保持高的水平, 但排卵率仅为 40%。这说明 T在诱导雌鳅排卵方面没有明显作用。对有自然性反转现象的黄鳊和赤点石斑鱼研究表明, T对雌鱼排卵也没有明显作用^[10, 16]。

实验中雌雄鱼血清 T变化趋势相似, 注射 RHLHa后, 7h显著升高, 24h极显著升高, 随后逐渐降低, T 72h与 0h浓度无显著差异, 7、24和 48h T浓度极显著高于对照组, 实验组轻压泥鳅腹部能挤出较多的精液。这说明 LHRHa能够刺激辜酮分泌, 加速雄泥鳅排精。其他鱼上也有类似的报道^[17, 18]。但有关 T诱导精子成熟和排精的调控机制比较复杂, 有待继续研究。

3.2 孕酮的作用

结果显示, 实验组雌鱼 24h P浓度为 (0.71 ± 0.082) ng/mL, 极显著高于 0h水平 ($P < 0.01$); P

浓度随后下降, 约 48h降至 (0.213 ± 0.025) ng/mL, 然后保持稳定直到实验结束。对照组雌鱼 P浓度在实验期间有波动, 7和 48h相对较高, 浓度分别为 (0.297 ± 0.055) ng/mL 和 (0.297 ± 0.025) ng/mL 显著高于 0h水平。结果表明: 一方面, 注射 LHRHa能够刺激雌鳅孕酮分泌; 另一方面, 实验组 P最高浓度仅 (0.71 ± 0.082) ng/mL, 浓度仍然较低, 且 t检验证明对照组和实验组组间无显著差异, 说明 LHRHa刺激泥鳅孕酮分泌能力有限。已报道的其他鱼类在繁殖季节孕酮浓度是本实验测定结果的数倍到数百倍^[19, 20]。这可能与实验动物种类差异、实验样本处理和测定方法不同等引起。有学者认为 LHRHa可以直接作用于黄体, 调节性激素分泌; 也有人认为 LHRHa通过刺激下丘脑分泌促性腺激素释放激素, 间接调节性类固醇激素分泌或两种现象都存在^[21]。LHRHa对性类固醇激素的具体调节机制比较复杂, 尚需实验探索或证明。

实验组排卵率为 40%, 而对照组无排卵现象, 这说明 P对诱导泥鳅排卵起作用。但实验组排卵率仍然很低仅为 40%, 这可能是因 P含量较低。t检验表明, 实验组和对照组雌鱼 P浓度无显著差异 ($P > 0.05$)也证明了这一点。对文昌鱼 (*Branchiostoma belchen*)性激素及其受体研究表明, 性激素在卵巢中的分布和浓度与其受体的分布及强度相关^[22]。有实验表明, P可代谢转化为 17α -P, 与体内 17α - 20β -P一起介导卵细胞最终成熟和排卵^[19, 23]。因此, 本实验排卵率低, 可能与激素受体在卵巢中的分布相关, 也可能是 P浓度低, 代谢为 17α -P和 17α - 20β -P (孕酮代谢物)介导卵细胞最终成熟和排卵途径受阻引起。

许多人工繁殖实验表明单独使用 LHRHa诱导泥鳅排卵效果差^[9, 24], 与本实验结果相似, 实验组排卵率仅为 40%。黄鳊和石斑鱼 (有自然性反转现象)对 LHRHa也不敏感, 注射 LHRHa诱导黄鳊 (96h)和埋植 LHRHa石斑鱼 (10d)排卵率低^[10, 16]。泥鳅具有自然性反转现象, 对 LHRHa同样不敏感, 诱导排卵率差。推断可能具自然性反转现象的鱼有不同于其他鱼类的特殊性类固醇调节机制。但许多催产实验表明, LHRHa配合其他催产剂 (如 DOM、 17α - 20β -P或 HCG等)使用, 不仅可以降低 LHRHa使用量, 而且排卵率可达 80%—95%, 明显提高了排卵率^[1, 17]。但其相互协作的原理及其调控性类固醇的途径仍不清楚。

实验组雄鱼, 24h P (0.527 ± 0.121) ng/mL 较

0h (0.190 ± 0.010) ng/mL 显著上升 ($P < 0.05$); 随后逐渐下降, 72h 降至 (0.197 ± 0.055) ng/mL, 与 0 和 96h 无显著差异。对照组雄鱼实验期间 P 浓度无显著变化。结果表明, LHRHa 同样能刺激雄鳅 P 分泌, P 对介导雄鱼精巢发育和排精可能有一定作用。用不同浓度 P 处理人精子穿透大鼠卵细胞实验表明, 一定浓度的 P 处理有利于精子穿越卵细胞, 提高人工受精的成功率^[25]。对文昌鱼性腺类固醇激素及其受体分布研究显示, 大生长期和成熟期, 精原细胞和精母细胞对 P 抗体发生强的免疫阳性反应^[22]。本实验 t 检验表明实验组显著高于对照组 ($P < 0.05$), 这些间接说明 P 对精巢发育发挥一定作用, 但有关 P 对调节精巢发育的作用研究较少, 需进一步研究。

3.3 雌二醇的作用

结果显示 (图 5), 试验组雌鱼 7h E_2 浓度为 (272.4 ± 4.2) pg/mL, 24h 浓度 (696.4 ± 26.2) pg/mL, 48h 浓度 (442.1 ± 26.7) pg/mL, 显著高于 0h 水平 (87.7 ± 3.5) pg/mL ($P < 0.05$); 0、72 和 96h 之间 E_2 浓度无显著差异 ($P > 0.05$)。实验期间, 对照组雌鱼 24h E_2 浓度为 (269.1 ± 36.6) pg/mL, 显著高于 0、7、48、72 和 92h E_2 浓度 ($P < 0.05$)。结果表明: RHLHa 能够刺激雌泥鳅 E_2 的分泌, 在一段时间 (7—48h) 内血清 E_2 浓度保持较高水平, 与 T 变化相似, 说明 E_2 可能在介导卵巢成熟方面发挥作用。有研究表明, E_2 可代谢转化为 17β - E_2 , 17β - E_2 参与卵泡的发育和卵黄蛋白的合成^[10, 19, 20]; 在其他鱼类上也有类似的报道^[1, 3, 12, 20, 26]。本实验中实验组雌鳅 GSI (15.34 ± 1.19) % 显著高于对照组 GSI (12.03 ± 1.18) %。实验期间, 实验组 E_2 浓度显著高于对照组 ($P < 0.05$), 并在一段时间内保持较高水平, 说明 E_2 确有促进卵巢发育的功能。 17β - E_2 对肝组织碱性磷酸酶的活性有显著调节作用, 对肝细胞转录因子有调控作用^[27]。因此, 作者认为 E_2 可能是通过如下途径对卵巢发育产生作用, E_2 经代谢转换为 17β - E_2 , 17β - E_2 调节碱性磷酸酶的活性以及调节肝细胞转录因子, 影响肝脏合成磷脂卵黄蛋白, 从而实现对卵巢发育的影响。

综上所述, LHRHa 能够刺激泥鳅性类固醇激素的分泌, 注射后 24h 性激素 P、T 和 E_2 均达到峰值, 但 P 浓度相对较低, 下降速度较快, 诱导泥鳅排卵效果差, 说明 P 可能对介导卵细胞最终成熟和排卵发挥重要作用; E_2 对卵巢发育起重要调节作用, 可能通过 E_2 代谢转化为 17β - E_2 , 影响肝组织碱性磷

酸酶的活性以及调节肝细胞转录因子, 实现对卵巢发育的调节。注射 LHRHa, 对照组 T 显著高于对照组, 雌雄鱼性腺类固醇激素 T 浓度最高, 雌雄鱼无显著差异, 显著提高雌鱼 GSI, 诱导雄鱼性腺发育成熟和排精。LHRHa 诱导雌泥鳅排卵效果差, 需要剂量高, 与具自然性反转现象的黄鳝和石斑鱼相似, 可能其性类固醇分泌调节机制有别于其他绝大多数鱼类 (无自然性反转现象)。

参考文献:

- [1] 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 Sunyatsen*, 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]
- [2] Zhao W X. Testosterone and 11-oxotestosterone changes during an annual cycle in blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala* [J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 1991, 22(5): 412—416 [赵维信. 团头鲂两种雄性激素浓度的周年变化. 海洋与湖沼, 1991, 22(5): 412—416]
- [3] Hou Y Y. Effects of gonadotropin releasing hormone (GnRH) and dopamine on gonadotropin (GTH) secretion from in vitro pituitary cells of rainbow trout [J]. *Journal of Lake Sciences*, 2001, 13(1): 51—56 [侯亚义. 促性腺激素释放激素和多巴胺对虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 离体脑垂体细胞分泌促性腺激素的影响. 湖泊科学, 2001, 13(1): 51—56]
- [4] King H R, Pankhurst N W. Effect of short-term temperature reduction on ovulation and LHRHa responsiveness in female Atlantic salmon (*Salmo salar*) maintained at elevated water temperatures [J]. *Aquaculture*, 2004, 238: 421—436
- [5] Kusat A M. Gonadal oocyte development in LHRHa hormone treated European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) Broodstock [J]. *Turk J Vet Anim Sci*, 2005, 29: 83—87
- [6] Shein N L. Ovarian development and final oocyte maturation in cultured sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* [J]. *Fisheries Science*, 2004, 70: 360—365
- [7] Jalabert B. In vitro oocyte maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) northern pike (*Esox lucius*), and goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *J. Fish Res Board Canada*, 1976, 33: 974—988
- [8] Crim L W. Control of gonadotropic hormone release in trout: influence of synthetic LH-RH and LH-RH analogues in vivo and in vitro [J]. *Life Sci*, 1981, 28: 129—155
- [9] Qu W L, Pan W Z, Guo J X. Inductive effect of 17α -hydroxy- 20β -dihydroprogesterone on ovulation of loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (Cantor) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1990, 14(2): 165—169 [曲维良, 潘伟志, 郭佳祥. 17α 羟基- 20β 双羟孕酮诱导泥鳅排卵的效应. 水产学报, 1990, 14(2): 165—169]

- [10] Zhou D G, Zheng W M, Zhang D X. Changes of sex steroids in *Monopterus albus* during its spawning induced with injection of LHRH-A [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1995, **19**(4): 311—316 [周定刚, 郑维明, 张大祥. 催产时黄鳝性类固醇激素含量变化的研究. 水生生物学报, 1995, **19**(4): 311—316]
- [11] Zhang L H, Zhang W M, Lin H R. The feedback effects of 4-androstene-3, 17 α -dione and 17-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]
- [12] Lin H R, Zhang M L, Zhang S M. Effects of sex steroids on gonadotropin synthesis and secretion, as well as ovarian development in female silver eel [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1994, **18**(3): 272—279 [林浩然, 张梅丽, 张素敏, 等. 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 (G_H)分泌和卵巢发育的作用. 水生生物学报, 1994, **18**(3): 272—279]
- [13] Zhang L H, Zhang W M, Lin H R. The mobilization of calcium and fat during the steroid hormone-induced maturation of female Japanese Eel (*Anguilla japonica*) [J]. *Acta Scientiarum Naturalium universitatis Sunyatsen*, 2001, **40**(92): 86—88 [张利红, 张为民, 林浩然, 等. 性类固醇激素诱导雌性日本鳗鲡性腺发育过程中钙和脂肪的动员. 中山大学学报, 2001, **40**(92): 86—88]
- [14] Tang X C, Liu C W. Effects of exogenous hormones on serum sex steroid hormones in *Plectorhynchus cinctus* [J]. *Marine Science (Experiment Technology)*, 2003, **27**(5): 5—7 [唐啸尘, 刘楚吾. 外源激素对花尾胡椒鲷血清性类固醇激素的影响. 海洋科学 (实验与技术), 2003, **27**(5): 5—7]
- [15] Wen H S, Song H X, Yang L T. Study on the effects of exogenous hormone on the plasma testosterone and estradiol levels in cultured Japanese Flounder [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2006, **28**(4): 115—120 [温海深, 宋海霞, 杨立廷. 外源激素对养殖牙鲆血清睾酮和雌二醇含量的影响研究. 海洋学报, 2006, **28**(4): 115—120]
- [16] Shu H, Liu X C, Lin H R. Development, sex steroid hormone secretion and ultrastructure of gonadotropic cell in *Epinephelus akaara* [J]. *Zoological Research*, 2005, **26**(4): 422—428 [舒琥, 刘晓春, 林浩然. LHRH-A缓释剂对雌性赤点石斑鱼卵巢发育、性类固醇激素分泌及脑垂体 G_H细胞超微结构的影响. 动物学研究, 2005, **26**(4): 422—428]
- [17] Shu H, Liu X C, Zhao H H. Milt production by male red spotted grouper (*Epinephelus akaara*) after injection of LHRHa, 17P or DOM, alone or in combination [J]. *Acta Scientiarum Naturalium universitatis Sunyatsen*, 2004, **43**(6): 42—44 [舒琥, 刘晓春, 赵会宏. 注射 LHRHa, 17-P及其他药物组合诱导赤点石斑鱼排精研究. 中山大学学报 (自然科学版), 2004, **43**(6): 42—44]
- [18] Song P, Xiong Q M. The annual cycle of serum estradiol and testosterone in spontaneous sex-reversing fish *Monopterus albus* [J]. *Journal of Wuhan University (Natural Science Edition)*, 1993, **2**: 115—120 [宋平, 雄全沐. 黄鳝血清睾酮和雌二醇含量周年变化规律的研究. 武汉大学学报 (自然科学版), 1993, **2**: 115—120]
- [19] Zhao W H, Hong W S, Zhang Q Y. Comparative studies on the levels of sex serum steroids and the levels of 17 α -P and prostaglandins of the gonads in the feral and cultured *Bostrichthys sinensis* [J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2005, **44**(Suppl): 195—199 [赵卫红, 洪万树, 张其永, 等. 中华乌塘鳢野生和养殖群体血清中性类固醇激素以及性腺 17 α -P和前列腺素含量的比较研究. 厦门大学学报 (自然科学版), 2005, **44**(增刊): 195—199]
- [20] Lahnsteiner F, Berger B, Kletzl M. Effect of 17 β -estradiol on gamete quality and maturation in two salmonid species [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, **79**: 124—131
- [21] Wang D S, Lin H R, Pu D Y. Domperidone-LHRH-A-Induced Ovulation of the Bagrid Catfish, *Myus Macropterus* and *Leiocassis longirostris* [J]. *Zoological Research*, 1998, **19**(3): 191—196 [王德寿, 林浩然, 蒲德永. 注射促黄体素释放激素类似物 and 地欧酮诱导大鲶和长吻排卵的研究. 动物学研究, 1998, **19**(3): 191—196]
- [22] Fang Y Q, Weng Y Z, Hu X X. Distribution of sex steroid hormones and their receptors in the gonads and nervous system of amphioxus (*Branchiostoma belcheri*) [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2001, **47**(4): 398—403 [方永强, 翁幼竹, 胡晓霞. 性类固醇激素及其受体在文昌鱼性腺和神经系统中的分布. 动物学报, 2001, **47**(4): 398—403]
- [23] Cai S L, Yang C H. Effect of 17 α -hydroxyprogesterone on in vitro culture of shrimp (*Penaeus chinensis*) [J]. *Aquatic Fisheries Research*, 2000, **21**(2): 7—11 [蔡生力, 杨丛海. 17 α 羟孕酮对离体培养的对虾卵巢组织发育的促进作用. 海洋水产研究, 2000, **21**(2): 7—11]
- [24] Zhang M Y, Zhu Y R. The comparative study on the ovulation increased in *M. isugunus anguilla caupatus* (Auror) by different dosage of reserpine, dopamine and LHRH-A [J]. *Fisheries Science*, 1998, **17**(3): 10—13 [张明宇, 朱逸仁. 不同剂量的利血平 LHRH-A 促进泥鳅排卵的比较研究. 水产科学, 1998, **17**(3): 10—13]
- [25] Wu W W, Gao X P. Effects of progesterone on the fertility ability of human sperm [J]. *Journal of Andrology*, 1996, **10**(2): 71—74 [吴无畏, 高晓平. 孕酮对人精子受精能力的影响. 男性学杂志, 1996, **10**(2): 71—74]
- [26] Bing X, Ru S G, Hiroko I. The identification of vitellogenin induction by 17 β -estradiol in male *Carassius auratus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2004, **28**(3): 236—240 [邢欣, 汝少国, Isoda Hiroko. 17 β 雌二醇对雄性金鱼卵黄原蛋白的传导作用. 水产学报, 2004, **28**(3): 236—240]
- [27] Ning Q J, Li E Z, Zhai X H. The regulation of exogenous exogenous estradiol in transcriptional activity of regenerating hepatocytes in rats [J]. *Acta Anatomica Sinica*, 2004, **35**(4): 413—416 [宁黔冀, 李恩中, 翟心慧. 外源性雌二醇对大鼠再生肝细胞转录活性的调节. 解剖学报, 2004, **35**(4): 413—416]

CHANGE DISCIPLINE OF SEX STEROID HORMONES IN SERUM OF LOACH(*MISGURNUS ANGUILLICAUDATUS*) INFECTED CHORIONIC GONADOTROPIN ANALOGUE(LHRHA)

QIN Zhi-Biao¹, FENG Jian¹, SUN Ting², HE Zhi², LUO Bo¹ and PANG Wei¹

(1. Institute of Aquatic, Guangxi University, Nanning 530004;

2. College of Animal Science, Sichuan Agriculture University, Ya'an 625014)

Abstract: This experiment was to clarify the change of sex steroid hormone in serum of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) infected LHRHa, and investigate actions of progesterone (P), testosterone (T) and estradiol (E_2) to gonadal development and regulatory mechanism. It contained two groups, control group and test group. The fish of control group were only injected physiological saline, and the fish of test group were injected chorionic gonadotropin analogue [D-Ser(tBu)6, Pro9-NEt] (LHRHa) (female fish 0.2ug/g and male fish 0.1ug/g). Blood samples were collected from caudal vein at 0, 7, 24, 48, 72 and 96h after implantation respectively, and T, E_2 and P contents in serum were measured. These results showed that T and E_2 in serum of female fish infected LHRHa were significantly higher than those of control group ($P < 0.05$). 24h after infection LHRHa, P, T and E_2 contents of female fish were 0.710 ± 0.082 ng/mL, 9.00 ± 0.57 ng/mL and 696.4 ± 26.2 pg/mL respectively; P and T of male fish were 0.527 ± 0.121 ng/mL and 9.62 ± 0.62 ng/mL respectively. Change discipline of female fish in test group was as following rule, basis level (0—7h) to rise gradually to the peak value (7—24h) to go down to basis level (24—48h) to maintain basis level (48—96h). The change discipline of T and E_2 in female fish and P and T in male fish were similar, to rise gradually to the peak value (0—24h) to go down gradually to basis level (24—48h) to maintain basis level (48—96h). After 24h, the T and E_2 contents of female fish in control group been significantly hoisted to 2.20 ± 0.18 ng/mL and 269.1 ± 36.6 pg/mL, but the P and T contents of male fish in control group changed unobviously ($P > 0.05$). The experimental results indicated that LHRHa could stimulate sex steroid hormone secretion of loach to female loach, especially T, and raised significantly the gonadosomatic index (GSI), but it had poor effect to induce ovulation. The reason may be that it had especial regulatory mechanism of steroid hormone. E_2 and T in loach could promote sex gland maturity. P may play important role in final maturity of oocyte and ovulation in loach, and E_2 and T had no obvious action in this way.

Key words: Loach; LHRHa; Progesterone; Testosterone; Estradiol