

斑鳢血清促性腺激素的季节变化和埋植甲基睾酮 对斑鳢促性腺激素分泌的影响^{*}

周立斌^{1,2}, 刘晓春¹, 马细兰², 林浩然¹, 李大疆³, 陈焜慈³, 李恒颂³, 邬国民³

(1. 中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室//
水生经济动物研究所和广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东 广州 510275;
2. 惠州学院生命科学系和生物技术研究, 广东 惠州 516007;
3. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380)

摘 要: 采用鲤鱼 GtH β -亚基(cGtH β)的标准品和抗血清建立了斑鳢异源的促性腺激素(Gonadotropin, GtH)放射免疫测定技术,并对斑鳢性腺指数(Gonadosomatic index, GSI)和GtH分泌的季节变化,以及埋植甲基睾酮(17 α -methyl-testosterone, MT)对斑鳢GtH分泌的影响进行了研究。结果表明:斑鳢雌雄鱼GSI值分别在5月份和6月份达到最高,与其他月份相比有显著性提高($P < 0.05$);斑鳢雌鱼血清GtH水平在6月份达到最高,与10月和12月相比有显著性提高($P < 0.05$),斑鳢雄鱼血清GtH水平在6月份达到最高,4月、10月和12月相比有显著性提高($P < 0.05$);雌雄鱼血清GtH水平表现出基本相同的变化趋势,并且血清GtH水平差异不显著($P > 0.05$);埋植MT对斑鳢雌雄鱼血清GtH水平有一定影响,在性腺发育初期能提高雌雄鱼血清GtH水平,而在性腺成熟和排卵期能降低雌雄鱼血清GtH水平。上述结果表明在斑鳢的人工繁殖中可以采用埋植MT的方法对斑鳢进行催熟和催产。

关键词: 斑鳢; 促性腺激素; 季节变化; MT

中图分类号: Q579.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579(2009)05-0103-05

Seasonal Changes of Serum Gonadotropin Levels and Effects of MT Implantation on GtH Secretion of Spotted Longbarbel Catfish (*Mystus guttatus*)

ZHOU Libin^{1,2}, LIU Xiaochun¹, MA Xilan²,

LIN Haoran¹, LI Dajiang³, CHEN Kuncu³, LI Hengsong³, WU Guoming³

(1. State Key Laboratory of Biocontrol, Institute of Aquatic Economic Animals,
and Guangdong Provincial Key Laboratory For Aquatic Economic Animals, Sun Yat-Sen University,
Guangzhou 510275, China; 2. Department of Life Science and Institute of Biotechnology,
Huizhou University, Huizhou 516007, China; 3. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese
Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: The seasonal changes of GSI and serum gonadotropin (GtH) levels of spotted longbarbel catfish (*Mystus guttatus* Lacépède), and effect of 17 α -methyl-testosterone (MT) implantation on GtH secretion were studied. Based on carp gonadotropin- β (cGtH- β) and its anti-serum (Rac), heterologous radio-immunoassay (RIA) for GtH of spotted longbarbel catfish was developed. These results showed gonadosomatic index (GSI) of female and male spotted longbarbel had the highest value in May and June, and was higher than those in other month significantly ($P < 0.05$); Serum GtH levels of female and

^{*} 收稿日期: 2008-11-12

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(06027456); 农业部热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室开放基金资助项目

作者简介: 周立斌(1972年生),男,副教授,博士;通讯作者: 刘晓春; E-mail: lsslx@mail.sysu.edu.cn

male spotted longbarbel catfish had the highest value in June, and was higher than those in other months (female in Oct and Dec, male in Apr, Oct and Dec) significantly ($P < 0.05$); The seasonal changes of serum GtH levels of male spotted longbarbel catfish were similar to those of female spotted longbarbel catfish, and no significant differences were observed among female fish with male fish in all months; MT implantation had effect on serum GtH levels of spotted longbarbel catfish, in early gonada development stage gonadal maturation and ovulation stage, MT implantation could increase serum GtH level of spotted longbarbel catfish, but in gonadal maturation and ovulation stage, MT implantation could decrease serum GtH level of spotted longbarbel catfish. These results indicated that MT implantation could have an effect on artificial propagation of spotted longbarbel catfish.

Key words: spotted longbarbel catfish (*Mystus guttatus*); GtH; seasonal change; MT

斑鳢 *Mystus guttatus* Lacépède 属于鲇形目 *Siluriformes*, 鳢科 *Bagridae*, 鳢属 *Mystus*, 是珠江水系名贵经济鱼类之一。但长期以来由于滥捕滥炸, 斑鳢资源日益枯竭, 使得苗种不足影响了养殖业的发展, 斑鳢的性腺发育的研究较少, 人工繁殖机理还没有完全弄清, 虽然人工繁殖试验有一定报道^[1], 但大规模的人工育苗始终未完全获得成功, 斑鳢的生殖生理以及斑鳢性腺发育成熟和与排卵有关的促性腺激素的分泌调控机理的研究尚属空白, 在一定程度上制约了人工繁殖研究的进展。

本研究采用鲤鱼 *Cyprinus carpio* GtH- β 亚基的标准品和抗血清建立斑鳢异源的 GtH 放射免疫测定技术, 并对斑鳢 GtH 分泌的季节变化, 以及 GtH 分泌活动的神经内分泌调节机理进行研究, 旨在丰富斑鳢繁殖生理学基础资料和为人工繁殖技术的建立提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验鱼取自广东省郁南县斑鳢人工繁殖试验基地, 雄鱼体长 48~85 cm, 体质量 2 400~3 750 g; 雌鱼体长 67~82 cm, 体质量 2 350~3 600 g。

1.2 斑鳢 GSI 和血清 GtH 的季节变化

分别在 4、5、6、8、10 和 12 月取样。每月选取雌雄鱼各 8 尾, 进行血清 GtH 的测定, 血清采样方法参照以前的报道^[2]。另外同时选取 5 尾雌雄鱼, 取性腺测定性腺指数 (GSI)。

1.3 埋植 17 α -MT 对斑鳢血清 GtH 水平的影响

埋植试验于 4 月份进行, 将斑鳢分成 2 组, 第 1 组 10 条雄鱼, 不埋植 MT, 作为对照组; 第 2 组 15 条雄鱼, 腹部埋植 MT (Sigma 公司产品, 硅塑料混合后制成长条), 埋植剂量 20 mg $\cdot$ kg⁻¹ 鱼体质量; 共进行 4 次埋植, 埋植相隔时间 15 第 1 次埋植 15 d 后进行血清取样, 作为第 1 次埋植试验

结果, 以后类推。雌鱼也按照上述分组进行。血清采样方法参照以前的报道^[2]。

1.4 GtH 异源 RIA 的建立

采用双抗体放射免疫测定法, 以 c GtH 为标记抗原和标准品。第一抗体为兔抗鲤鱼血清 (rabbit-anti-carp GtH- β serum, Rac GtH- β , 美国 Arnel 公司产品); 第二抗体为羊抗兔 γ -球蛋白血清 (goat-anti-rabbit- γ -globulin serum, GAR, 美国 Arnel 公司产品)。参照王德寿等^[3]方法略作修改, 按 GtH 不同浓度和稀释倍数建立标准曲线、血清样品稀释曲线。

1.5 数据处理和计算

实验所得数据均表示为平均数 $\pm$ 标准误, 采用 SPSS11.0 软件统计包中的 Duncan's 法检验, 当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结果

2.1 斑鳢血清稀释液中 GtH 与兔抗鲤鱼血清 (Rac GtH- β) 的交叉免疫反应

如图 1 示, B 为斑鳢血清中 GtH 与 Rac GtH-

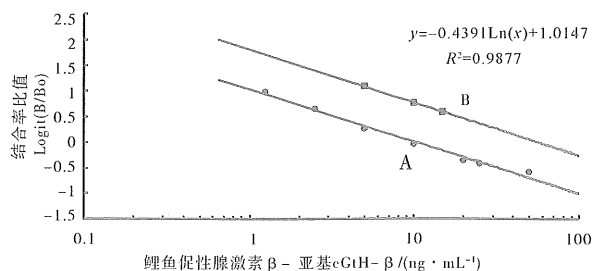


图 1 鲤鱼促性腺激素 β 亚基 (c GtH- β) 的标准曲线 (A) 以及斑鳢血清 (B) 中 GtH 与 c GtH- β 的竞争抑制曲线

Fig. 1 Dose-response inhibition curves for carp GtH- β (A) and serial dilutions of serum (B) obtained from spotted longbarbel catfish

β 的竞争曲线, 它与 c GtH- β 的标准曲线 A 平行 (2 条曲线的横坐标和纵坐标均经过对数转换, 用直线表示), 说明鲤鱼 Rac GtH- β 抗血清和斑鳢的 GtH 有很好的免疫交叉反应, RIA 测定是有效而可行的。

2.2 斑鳢雌雄鱼 GSI 的季节变化

斑鳢雌雄鱼 GSI 的季节变化见图 2 和图 3。从图 2 可以看出, 斑鳢雌鱼 GSI 值在 6 月份达到最高, 与其他月份相比有显著性提高 ($P < 0.05$)。从图 3 可以看出, 斑鳢雄鱼 GSI 值在 5 月份达到最高, 与其他月份相比有显著性提高 ($P < 0.05$)。

2.3 斑鳢血清 GtH 水平的季节变化

斑鳢血清 GtH 水平的季节变化见图 4。从图 4 可以看出, 斑鳢雄鱼血清 GtH 水平在 6 月份达到最高, 与 4 月、10 月和 12 月相比有显著性提高 ($P < 0.05$); 斑鳢雌鱼血清 GtH 水平在 6 月份达到

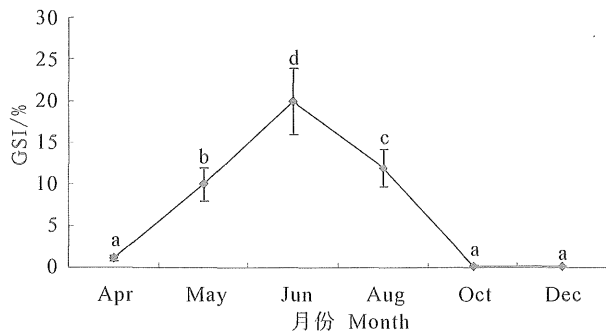


图2 斑鳢雌鱼 GSI 的季节性变化

Fig. 2 The seasonal changes of GSI of female spotted longbarbel catfish

(各值为平均值 $\pm$ 标准误, 图中标有不同字母者表示 GtH 水平有显著差异, $P < 0.05$, Duncan's 检验, $n = 5$)

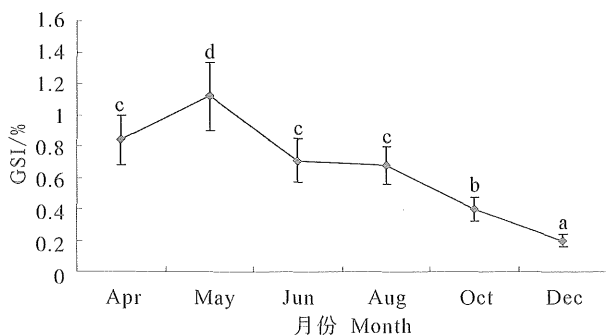


图3 斑鳢雄鱼 GSI 的季节性变化

Fig. 3 The seasonal changes of GSI of female male spotted longbarbel catfish

(各值为平均值 $\pm$ 标准误, 图中标有不同字母者表示 GtH 水平有显著差异, $P < 0.05$, Duncan's 检验, $n = 5$)

最高, 与 10 月和 12 月相比有显著性提高 0.05)。另外雌雄鱼血清 GtH 水平表现出基本相同的变化趋势, 并且血清 GtH 水平差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.3 埋植 MT 对斑鳢血清 GtH 水平的影响

埋植 MT 对斑鳢雄鱼血清 GtH 水平的影响见图 5。从图 5 可以看出, 第 1、第 2 和第 4 次埋植 MT 能提高对斑鳢雄鱼血清 GtH 水平, 第 3 埋植 MT 降低了斑鳢雄鱼血清 GtH 水平; 随着埋植次数的增加, 斑鳢雄鱼血清 GtH 水平逐渐增高, 第 4 次埋植后斑鳢雄鱼血清 GtH 水平达到最高。

埋植 MT 对斑鳢雌鱼血清 GtH 水平的影响见图 6。从图 6 可以看出, 第 1 和第 2 次埋植 MT 能提高对斑鳢雌鱼血清 GtH 水平, 第 3 和第 4 次埋植 MT 降低了斑鳢雌鱼血清 GtH 水平, 随着埋植次数的增加, 斑鳢雌鱼血清 GtH 水平逐渐增高, 第 4 次埋植后斑鳢雌鱼血清 GtH 水平达到最高。

3 讨论

由于从鱼类脑垂体中分离和纯化大量 GtH 比较困难, 因此一些学者采用已有的异源鱼类 GtH 标准品和其抗血清进行一些特有鱼类的 GtH 放射免疫测定, 并获得了成功^[2-3]。因此我们采用了 cGtH- β 标准品和其抗血清 (Rac GtH- β), 对 cGtH- β 进行¹²⁵I 标记, 测定了斑鳢血清 GtH 水平, 从图 1 中可知样品的稀释曲线与标准曲线平行, 证明该方法可以用于斑鳢血清 GtH 水平的测定。

斑鳢雌雄鱼血清 GtH 水平的季节变动鲇形目中鲇鱼^[4]和大鳍鲇^[5]相类似, 血清中的 GtH 水平都是在排卵期间逐步升高, 在产卵繁殖高峰期 6 月份达到最高水平, 产卵之后就逐渐下降, 在 12 月份达到最低。另外, 斑鳢雌雄鱼血清 GtH 水平的变动表现出相同的变化趋势, 并且雌雄鱼血清 GtH 水平没有显著性的差异, 这个结果与大鳍鲇^[5]相似而与鲇鱼^[4]不同, 在鲇鱼的产卵期间, 雌鱼血清 GtH 水平显著高于雄鱼, 而且水温越高, 差异越大^[4], 表明斑鳢雄鱼的精子发生和排精可能也需要较高的 GtH 水平。另外, 斑鳢雌雄鱼 GSI 的季节变化有所不同, 雄鱼 GSI 值在 5 月份达到最大值, 而雌鱼则是在 6 月份达到最大值, 斑鳢雌鱼血清 GtH 水平 GSI 的季节变化表现出十分吻合的变化趋势, 雌鱼血清 GtH 与 GSI 相关系数 $R = 0.903$, 与斑鳢开始产卵的时间紧密相连, 表明血清 GtH 峰值的到来是斑鳢开始产卵的信号^[4]。在池塘养殖条件下, 非洲鲇鱼在繁殖期前脑垂体储存大量 GtH, 繁殖期时只是连续少量地释放出来, 仅可维

持配子发生和类固醇合成,但不能导致自发产卵^[6],所以斑鳊血清 GtH 水平的升高对精子生成和卵母细胞的成熟是相当必要的,因而可以采用外源激素诱导斑鳊 GtH 分泌和性腺发育成熟。

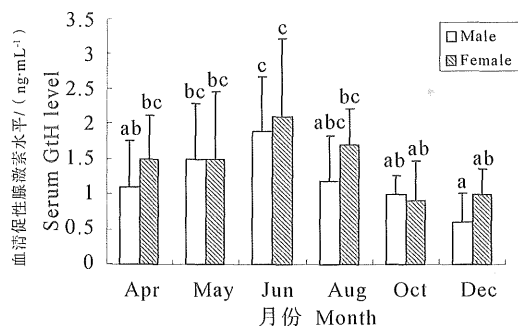


图 4 斑鳊血清 GtH 水平的季节性变化
Fig. 4 The seasonal changes of serum GtH level of spotted longbarbel catfish (雌鱼 $n=8$, 雄鱼 $n=8$)

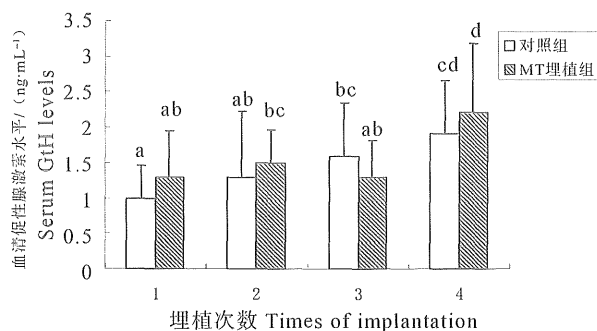


图 5 埋植 MT 对斑鳊雄鱼血清 GtH 水平的影响
Fig. 5 Effects of MT implantation on serum GtH level of male spotted longbarbel catfish (对照组 $n=10$; MT 埋植组 $n=15$)

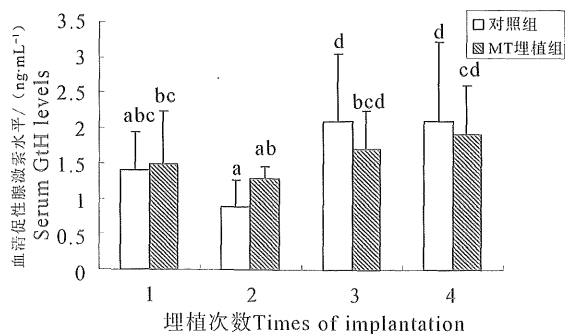


图 6 埋植 MT 对斑鳊雌鱼血清 GtH 水平的影响
Fig. 6 Effects of MT implantation on serum GtH level of female spotted longbarbel catfish (对照组 $n=10$; MT 埋植组 $n=15$)

性类固醇激素对硬骨鱼类的 GtH 分泌有正和负反馈作用。在未成熟鱼类中性类固醇激素对 GtH 释放的正反馈调节作用主要是通过增加脑垂体 GtH 的合成,在 1 龄大西洋鲑鱼 *Salmo salar* 的脑垂体和下丘脑外侧结节核埋植睾酮 (Testosterone, T),能使 GtH 在血液中的浓度和在脑垂体中的含量明显增加^[7]; 幼鲢鱼 *Silurus asotus* 中,埋植雌二醇 (Estradiol, E₂) 和 T 也能使脑垂体 GtH- II 含量增加; MT 能促进离体长臀鲢脑垂体 GtH 的分泌^[8],和上述结果相类似,本试验中,埋植 MT 在性腺发育成熟初期 (第 1 和第 2 次埋植) 可以增加斑鳊雌雄鱼血清中 GtH 水平,这些结果也表明 GnRH 对 GtH 释放刺激需要性类固醇激素的启动^[9]。在性成熟的硬骨鱼类中,性类固醇激素对 GtH 的释放却有正负两方面的反馈调节作用,对成熟金鱼 *Carassius auratus* 的研究表明, T 和 E₂ 不影响基础 GtH 水平,但能增强离体^[10] GnRH 诱导 GtH 细胞的分泌;而在繁殖季节给成熟的雄鳊鱼注射睾酮,或者在脑垂体埋植 11-酮基睾酮,血液中很高的 GtH 水平就会降低下来^[7]。本试验中,斑鳊雄鱼在第 3 次埋植后、雌鱼在第 3 和第 4 次埋植后都出现了血清 GtH 水平比对照组降低的现象,因为此时斑鳊雌雄鱼正处于产卵和排精高峰期,这种负反馈作用的机理是当血液中的类固醇性激素 (雌激素或雄激素) 达到一定水平时就会和脑垂体与下丘脑的特异性受体结合,使 GtH 分泌降低。

MT 是人工合成的睾酮类似物,在体内可转化为 11-酮基睾酮,睾酮可促进离体培养的底鳉 *Fundulus heteroclitus* 的精巢发育^[11]; MT 对斑鲃 *Ictalurus punctatus* 和精子发生有促进作用^[12], MT 也可诱导离体培养的雄性日本鳊精巢精子发生的全过程^[13],埋植 MT 也能诱导鳊性腺发育成熟^[14],因此在斑鳊的人工繁殖试验中,可以在斑鳊性腺发育成熟初期,采用埋植 MT 的方法,促进 GtH 的合成和分泌,进一步诱导精巢和卵巢的发育成熟。

参考文献:

- [1] 周路,杨凯,杨兴,等. 野生斑鳊人工繁殖试验[J]. 贵州农业科学,2008,36(1):123-124.
ZHOU L, YANG K, YANG X, et al. Artificial propagation of wild mystus guttatus [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2008,36(1):123-124.
- [2] 周立斌,刘晓春,林浩然,等. 长臀鲢脑垂体和血清中促性腺激素的生殖周期变化[J]. 动物学报,2003,49(3):399-403.
ZHOU L B, LIU X C, LIN H R, et al. Changes in pitui-

- tary and serum gonadotropin levels in helmet catfish (*Cranoglanis boudierius*) at different stages of ovarian development[J]. *Acta Zool Sin*, 2003, 49(3):399-403.
- [3] 王德寿,林浩然,GOOS H J TH. 大鳍鲩促性腺激素分泌调控的研究[J]. *动物学报*, 1998, 44(3):322-328.
- WANG D S, LIN H R, GOOS H J TH. Studies on the regulation of gonadotropin secretion in the bagrid catfish, *Mystus macropterus*[J]. *Acta Zool Sin*, 1998, 44(3):322-328.
- [4] 温海深. 野生鲇鱼性腺发育成熟与产卵的神经内分泌调节机制[D]. 广州:中山大学, 2001:37-40.
- WEN H S. The neuroendocrine regulational mechanism of gonadal maturation and ovulation in feral catfish (*Silurus asotus*)[D]. Guangzhou:Sun Yat-sen University, 2001:37-40.
- [5] 王德寿,林浩然,GOOS H J TH. 大鳍鲩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6辑). 北京:科学出版社, 1997:22-27.
- WANG D S, LIN H R, GOOS H J TH. Seasonal changes of the pituitary and serum basal gonadotropin(GTH) levels of the bagrid catfish *Mystus macropterus*[C]// Transactions of the Chinese ichthyological society(No. 6). Beijing: Science Press, 1997:22-27.
- [6] VAN OORDT P G W J, GOOS H J TH. The African catfish, *Clarias gariepinus*, a model for the study of reproductive endocrinology in teleosts[J]. *Aquaculture*, 1987, 63:15-26.
- [7] 林浩然. 鱼类生理学[M]. 广州:广东省高教出版社, 1999:180.
- LIN H R. The Physiology of Fishes[M]. Guangzhou:Guang Dong Province Higher Education Press, 1999:180.
- [8] 周立斌,刘晓春,叶卫,等. 17β -雌二醇和甲基睾酮对离体长臀鲩脑垂体促性腺激素分泌的影响[J]. *中国水产科学*, 2005, 12(2):113-118.
- ZHOU L B, LIU X C, YE W, et al. In vitro studies of effects of 17β -estradiol and methyl- testosterone on gonadotropin secretion by pituitary of helmet catfish (*Cranoglanis boudierius*) [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, 12(2):113-118.
- [9] CRIM L W, EVANS D W. Influence of testosterone and/or luteinizing hormone releasing hormone analogue on precocious sexual development in the juvenile rainbow trout [J]. *Biol Reprod*, 1983, 29:137-142.
- [10] TRUDEAU V L, SOMOZA G M, NAHORNIAK C S, et al. Interactions of estractions of estradiol with gonadotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone in the control of growth hormone secretion in the goldfish [J]. *Neuroendocrinol*, 1992, 56:483-490.
- [11] COCHRAN R C. In vivo and in vitro evidence for the role of hormones in fish spermatogenesis [J]. *J Exp Zool*, 1992, 261:143-150.
- [12] GANNAM A L, LOVELL R T. Effects of feeding 17α -methyl-testosterone, 11-keto- testosterone, 17β -estradiol, and 3,5,3'-triiodothyro-nine to channel catfish, *Ictalurus punctatus*[J]. *Aquaculture*, 1991, 92:377-388.
- [13] 邓岳松. 激素诱导塘养日本鳗鲡发育成熟的研究[D]. 广州:中山大学, 2000.
- DENG Y S. Hormonal induced gonadal development and maturation in cultivated Japanese eel (*Anguilla japonica*) [D]. Guangzhou:Sun Yat-sen University, 2000.
- [14] 张利红,张为民,林浩然. 雄烯二酮和甲基睾酮诱导雄性日本鳗鲡性腺发育的作用[J]. *动物学研究*, 2001, 22(2):89-92.
- ZHANG L H, ZHANG W M, LIN H R. Effects of 4-Androstene-3, 17-Dione and 17α - Methyl- testosterone on induction of gonadal maturation in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*) [J]. *Zoological Research*, 2001, 22(2):89-92.