

促性腺激素释放激素类似物 地欧酮对长臀鲢血清雌二醇和睾酮质量浓度的影响^{*}

周立斌^{1,2}, 刘晓春¹, 林浩然¹, 叶卫³

(1. 中山大学水生经济动物研究所 // 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, 广东 惠州 516007;
3. 番禺国家级罗非鱼良种场, 广东 广州 511453)

摘要: 采用放射免疫测定技术, 对长臀鲢 (*Cranoglanis boudierus*) 在不同的性腺发育时期的血清雌二醇 (E_2) 和睾酮 (T) 质量浓度变动, 以及注射促性腺激素释放激素类似物 (GnRH-A) 地欧酮 (DOM) 后的血清 E_2 和 T 质量浓度变动进行了研究。结果表明: 血清 E_2 质量浓度在雌鱼的性腺发育期明显升高, 在性腺成熟期开始下降, 性腺退化期降到最低; 血清 E_2 质量浓度在雄鱼的性腺发育过程中缓慢升高, 并持续保持较低质量浓度, 到性腺退化期略有升高。血清 T 质量浓度在雌雄鱼的变化情况相似, 性腺发育期明显升高, 而在性腺成熟期开始降低, 到退化期降到最低。注射 GnRH-A 能显著提高性腺处于不同发育时期的雌鱼的血清 E_2 质量浓度和雄鱼的血清 T 质量浓度, 注射多巴胺拮抗剂地欧酮 (DOM) 对血清 E_2 和 T 质量浓度没有影响, 但是 GnRH-A 和 DOM 联合注射能使雌雄鱼血清 E_2 和 T 质量浓度提高, 在性腺发育期尤为明显, 这和 GnRH-A+DOM 促进血清 GH 水平提高相一致。

关键词: 长臀鲢; 促性腺激素释放激素类似物; 雌二醇; 睾酮

中图分类号: Q959.483 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2007) 04-0069-05

鲇形目 (Siluriformes) 鱼类在世界养殖鱼类中占有重要的位置。长臀鲢 (*Cranoglanis boudierus* Richardson) 是鲇形目中名贵经济鱼类, 属于长臀鲢科 (Cranoglanidae), 长臀鲢属 (*Cranoglanis*), 具有重要的开发利用价值。但长期以来由于滥捕滥炸, 长臀鲢天然资源日益枯竭, 人工繁殖技术也未取得完全成功, 使得苗种不足影响了养殖业的发展。国内外对胡子鲇科^[1-2]、鲿科^[3]、鲇科^[4]等鲇形目鱼类的生殖内分泌生理有一定研究, 但对长臀鲢科的生殖生理、长臀鲢精子生成、排精、排卵有关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。

本研究采用放射免疫技术, 对长臀鲢在性腺发育期, 性腺成熟期和性腺退化期血清 E_2 和 T 质量浓度变动, 以及注射 GnRH-A/DOM 后的血清 E_2 和 T 质量浓度变动研究, 为长臀鲢的人工繁殖技术的建立提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验鱼取自番禺国家级罗非鱼良种场, 共计

110 尾 (雌鱼 55 尾, 雄鱼 55 尾)。其中用于季节性血清样品测定的雌鱼为 15 尾, 雄鱼 15 尾; 用于在体注射实验的雌鱼 40 尾, 雄鱼 40 尾。

1.2 血清性类固醇激素样品的采集

分别在 3 月、6 月和 10 月取样。每次选取雌雄鱼各 5 尾, 采样方法参照以前的报道^[5]。

1.3 注射 GnRH-A/DOM 对长臀鲢血清性类固醇激素水平的影响

依性腺发育状况在长臀鲢性腺发育期 (2—4 月)、性腺成熟期 (5—7 月) 和性腺退化期 (9—11 月), 分别在 3 月、6 月和 10 月进行注射实验。每个发育期选取雌雄鱼各 5 尾, 雌雄鱼都分成 4 组, 分别腹腔注射, 分组、注射和取样参照文献^[5]。

1.4 激素测定

血清 E_2 、T 质量浓度采用放射免疫方法 (RIA) 测定。放射免疫测定试剂盒购自北京原子能科学研究院同位素研究室 (北京), E_2 的测量灵敏度为 2 pg/mL。批内变异系数 (CV) 平均 6.5% ($n=10$); 批间变异系数为 8.3% ($n=10$)。在血

* 收稿日期: 2006-09-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970586); 广东省自然科学基金资助项目 (04300587); 广东海洋渔业局淡水鱼类繁育中心资助项目

作者简介: 周立斌 (1972 生), 男, 副教授, 博士; 通讯联系人: 林浩然, E-mail: Lshh@mail.sysu.edu.cn

清样品中加入低、中、高已知质量浓度的 E_2 ，测定回收率为 101.5% ~ 114%。 T 的测量灵敏度为 3 ng/mL，批内变异系数 (CV) 小于 10% ($n=10$)；批间变异系数小于 15% ($n=10$)。回收率为 107% ~ 110%。样品测定均采用双管平行。

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 (Mean $\pm$ SE)，采用 SPSS 软件统计包中的 Duncan 法检验，当 $P<0.05$ 时认为差异显著。

2 结 果

2.1 长臀鲮血清 E_2 在不同性腺时期的质量浓度

长臀鲮雌鱼血清 E_2 质量浓度在性腺发育期显著升高，性腺成熟时开始降落，到性腺退化时降到最低；雄鱼血清 E_2 质量浓度在精巢不同发育期变化不大，持续保持较低水平 (图 1)。

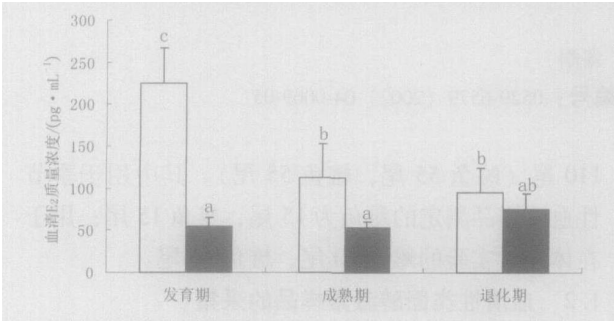


图 1 不同性腺发育期长臀鲮血清 E_2 质量浓度的变动

Fig 1 The seasonal changes of serum E_2 consistency in different development stage of Hemibarbus maculatus

(各值为平均值 $\pm$ 标准误，标有不同字母者表示 E_2 水平有显著性差异，Duncan 检验， $n=5$ 图 2—4 同。□ 和 ■ 分别表示雌鱼和雄鱼，图 2 同)

2.2 长臀鲮血清 T 在不同性腺时期的质量浓度

血清 T 质量浓度在性腺发育期显著升高，成熟期时急剧降低，到退化期又有所升高；雄鱼血清 T 质量浓度在性腺发育期升高，随后降低，并持续到退化期 (图 2)。

2.3 注射 GnRH-A/DCM 对长臀鲮雌鱼血清 E_2 和 T 质量浓度的影响

注射 GnRH-A 使性腺发育期的长臀鲮雌鱼的

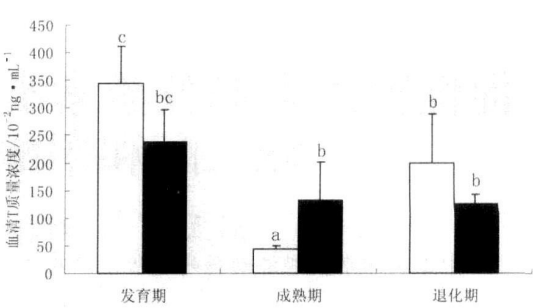


图 2 不同性腺发育期长臀鲮血清 T 质量浓度的变动
Fig 2 The seasonal changes of serum T consistency in different development stage of Hemibarbus maculatus
(图例同图 1)

血清 E_2 和 T 质量浓度显著提高，并持续 24 h 注射 DCM 没有作用，但 GnRH-A 和 DCM 联合注射能使血清 E_2 和 T 质量浓度进一步提高，并持续 24 h (图 3 A)。

注射 GnRH-A 使性腺成熟期的长臀鲮雌鱼的血清 E_2 和 T 质量浓度显著提高，并持续 12 h 注射 DCM 没有作用，GnRH-A 和 DCM 联合注射亦促使血清 E_2 和 T 质量浓度显著升高 (图 3 B)。

注射 GnRH-A 使性腺退化期的长臀鲮雌鱼的血清 E_2 和 T 质量浓度显著提高，能持续 6 和 12 h 注射 DCM 没有作用，但 GnRH-A 和 DCM 联合注射使血清 E_2 和 T 质量浓度显著升高并持续 12 和 24 h (图 3 C)。

2.4 注射 GnRH-A/DCM 对长臀鲮雄鱼血清 E_2 和 T 质量浓度的影响

在不同的性腺发育期，单独注射 GnRH-A 或 DCM 对长臀鲮雄鱼的血清 E_2 质量浓度没有作用，但 GnRH-A 和 DCM 联合注射能促使性腺发育期长臀鲮血清 E_2 质量浓度短时期显著升高 (图 4 A 左，B 左，C 左)。

注射 GnRH-A 使性腺发育期、性腺成熟期和性腺退化期的长臀鲮雄鱼血清 T 质量浓度显著提高，并能持续 12 ~ 24 h 注射 DCM 没有作用，但 GnRH-A 和 DCM 联合注射能显著升高各个时期血清 T 质量浓度，并能持续 12 ~ 24 h (图 4 A 右，B 右，C 右)。

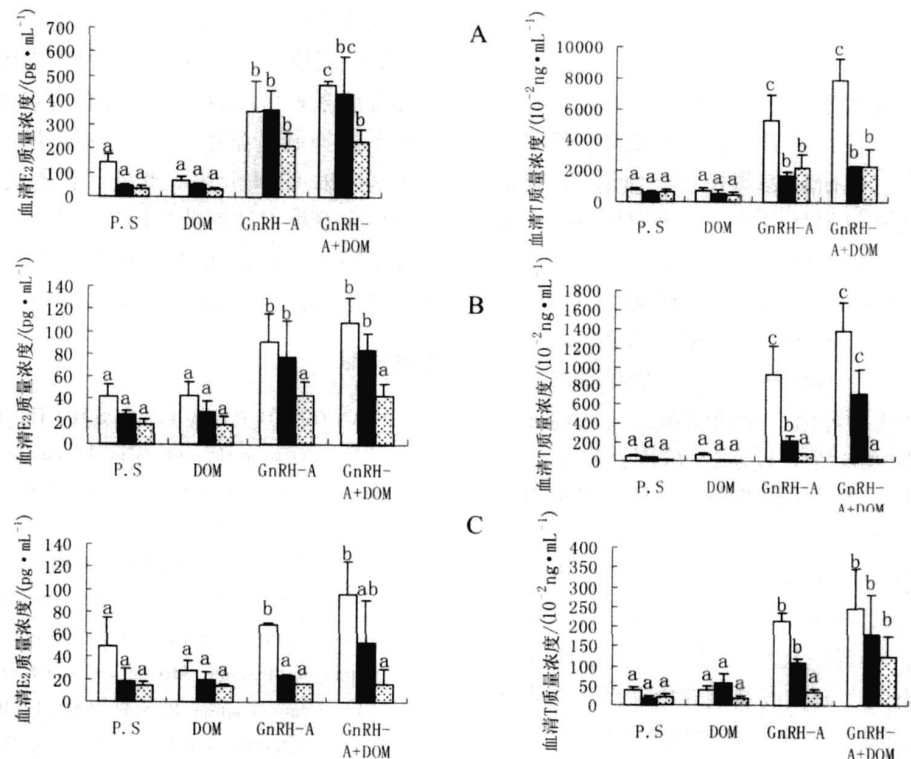


图3 注射 GnRH - A/DOM 对性腺发育期(A), 性腺成熟期(B)及性腺退化期(C)的长臀鲮雌鱼血清 E₂ 和 T 质量浓度的影响
Fig.3 Effects of GnRH - A alone and in combination with DOM on the serum E₂ and T consistency of female helmet catfish in different gonadal development stage
(□、■和▨分别代表注射 6 h、12 h、24 h 取样, 图 4 同)

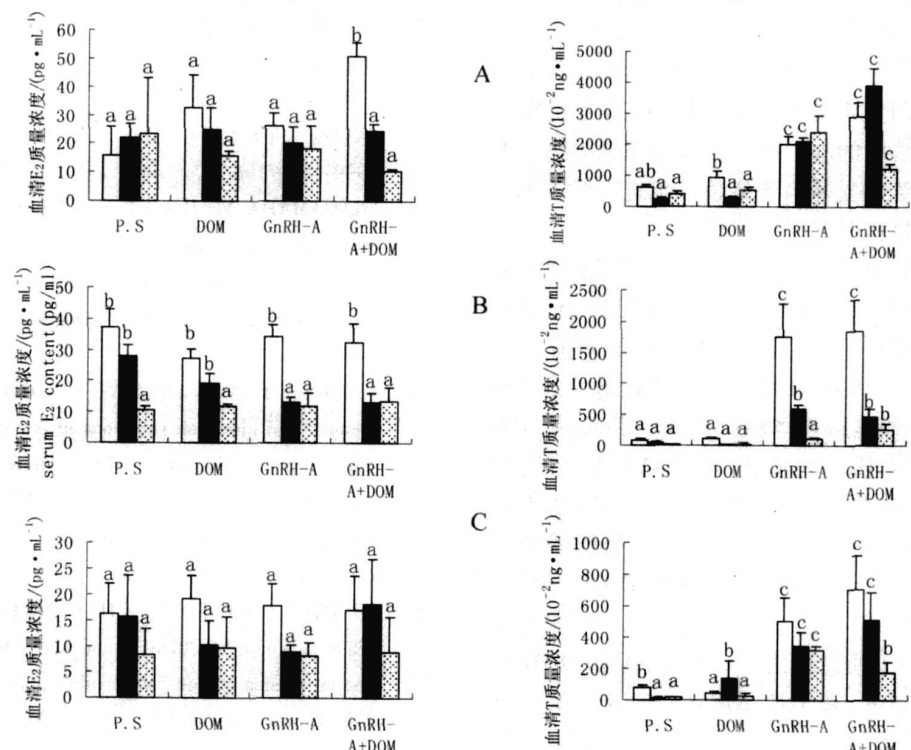


图4 注射 GnRH - A/DOM 对性腺发育期 (A), 性腺成熟期 (B) 及性腺退化期 (C) 的长臀鲮雄鱼血清 E₂ 和 T 质量浓度的影响
Fig.4 Effects of GnRH - A alone and in combination with DOM on the serum E₂ and T consistency of male helmet catfish in different gonadal development stage
(图例同图3)

3 讨 论

性类固醇激素水平在鱼类性腺发育的各个时期都是不一样的,并且在鱼类性腺发育成熟过程中起着重要作用^[6-7]。本研究表明长臀鲩血清 E_2 质量浓度的季节变化和鲇形目中的一些鱼类相似,在印度鲇鱼 (*Heteropneustes fossilis* B pch)^[8]、革胡子鲇 (*Clarias gariepinus* Burchell)^[9]、棕鲷 (*Ictalurus nebulosus* Lesueur)^[10]和斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus* Rafinesque)^[11],血清中 T 和 E_2 的质量浓度在 4 月快速增长并达到峰值,而在卵黄生成后期逐渐降低。长臀鲩雌鱼血清中 E_2 质量浓度在卵巢发育期间达到高峰并且在卵巢成熟期时降低,表现出与卵巢发育阶段的密切关系;同时表明了 E_2 在雌鱼生殖过程中调节卵黄生成具有重要的功能^[12]。雌鱼血清 T 质量浓度的变化和 E_2 相类似,只是在退化期略有升高。长臀鲩雄鱼血清 T 质量浓度在性腺发育期显著升高,而在成熟期开始降低,一直持续到退化期,表明在性腺发育期间 T 的高质量浓度为精子生成和排精做准备^[9]。雄鱼血清 E_2 质量浓度在不同发育期变化不大,表明 E_2 对成熟雄鱼的精子形成和排精作用不大。雌鱼和雄鱼相比,在性腺发育期及成熟期的雌鱼血清 E_2 质量浓度显著高于雄鱼,进一步表明了 E_2 对卵黄生成的调节作用;雌鱼在性腺发育期的血清 T 质量浓度高于雄鱼,这可能是因为 T 是 E_2 的前体,由于芳化作用减弱使它在血清中的水平增加,而在性腺成熟期雄鱼血清 T 质量浓度显著高于雌鱼,也进一步表明 T 在精子出现和排精时起了一定作用^[13]。

注射促性腺激素释放激素使性类固醇激素产生是通过 GTH 的释放来实现的^[9]。我们先前的研究表明,注射 GnRH-A 能显著提高长臀鲩血清 GTH 水平;GnRH-A 和 DOM 结合注射能显著增强 GnRH-A 促进长臀鲩脑垂体释放 GTH 使血清 GTH 水平升高,而单独注射多巴胺 (DA) 的拮抗物 DOM 未能促使脑垂体释放 GTH 血清 GTH 水平未能升高^[3]。本研究中 GnRH/DOM 对长臀鲩雌鱼血清 E_2 和 T 质量浓度的影响和 GnRH/DOM 对 GTH 释放的研究结果相一致,即注射 GnRH-A 能显著增加血清 E_2 和 T 质量浓度, GnRH-A 和 DOM 联合注射能使血清 E_2 和 T 质量浓度进一步升高,这个效果在性腺发育期更加明显。但是单独注射 DOM 未能促使雌鱼血清 E_2 和 T 质量浓度升高,而在长臀鲩雄鱼中,单独注射 GnRH-A 和与 DOM 联合注射都能使雄鱼血清 T 质量浓度显著增加,而对 E_2 质量浓度只是在性腺发育期略有作用,表

明了 T 在雄鱼中所起的重要作用。本研究结果进一步证明长臀鲩促性腺激素的释放受到下丘脑分泌的促性腺激素释放激素和多巴胺的双重调节,但多巴胺不能抑制基础的 GTH 分泌,只能抑制 GnRH-A 诱导的 GTH 分泌。此外,长臀鲩雌雄鱼在不同性腺发育期对注射药物的反应不一样,可能归因于几个因素,包括垂体对 GnRH 的反应性^[14]、循环 GTH 的清除^[15]及性腺的感受性等^[16]。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] E A DUBOIS, S SLOB, ZANDBERGEN M A, et al. Gonadal steroids and the maturation of the species-specific gonadotropin-releasing hormone system in brain and pituitary of the male African catfish (*Clarias gariepinus*) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2001, 129B: 381—387.
- [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.
- [4] 温海深, 林浩然. 促黄体素释放激素类似物和多巴胺拮抗物对鲇促性腺激素释放的作用 [J]. *水产学报*, 2001, 25(5): 393—397.
- [5] 周立斌, 刘晓春, 林浩然, 等. 长臀鲩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.
- [6] 林浩然. 鱼类生理学 [M]. 广州: 广东省高教出版社, 1999: 181—196.
- [7] NAGAMAH Y. Role of steroid hormones in gonadal growth and maturation in teleosts [C] // *Fish Physiology, fish toxicology and fisheries management: Proceedings of an international symposium, Guangzhou, China 1988*. 46—61.
- [8] LAMBA V J, GOSWAMI S V, SUNDARARAJ B J. Circannual and circadian variations in plasma levels of steroids (cortisol, estradiol-17 β , estrone and testosterone) correlated with the annual gonadal cycle in the catfish *Heteropneustes fossilis* B pch [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1983, 50: 205—225.
- [9] RICHTER C J J, EDING E H, GOOS H J Th, et al. The effect of pinazide-LHRHa and 17 α -hydroxyprogesterone on plasma steroids and ovulation in the African catfish *Clarias gariepinus* [J]. *Aquaculture*, 1987, 63: 157—168.
- [10] ROSENBLUM P M, PUDNEY J, CALLARD I P, et al. Gonadal morphology, enzyme histochemistry and plasma steroid levels during the annual reproductive cycle of male and female brown bullhead catfish *Ictalurus nebulosus* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1983, 50: 205—225.

- posus Lesucur J. J Fish Biol 1987 31: 325—341.
- [11] MACKENZIE D S PETER T FARRAR S M Seasonal changes in the thyroid and reproductive steroid hormone in female channel catfish *Ictalurus punctatus* in pond culture J. Aquaculture 1989 78: 63—80
- [12] SPECKER J L SULLIVAN C V Vitellogenesis in fishes: status and perspectives [C] // DAVEY K G et al eds Perspectives in Comparative endocrinology Ottawa: National Research Council of Canada 1993 304—315
- [13] 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
- [14] SOKOLOWSKA M PETER R E NAHORNIAK C S et al Seasonal effects of pimoide and des G₁₀[D= A₆] LHRH—A ethylamide on gonadotropin secretion in goldfish J. Gen Comp Endocrinol 1985 52: 472—479
- [15] COOK A F PETER R E Plasma clearance of gonadotropin in goldfish *Carassius auratus* during the annual productive cycle J. Gen Comp Endocrinol 1980 42: 76—90
- [16] LIN Y W P IAMARCA M J WALLACE R A Fundulus heteroclitus gonadotropin(s₂) . Homologous bioassay using oocyte maturation and steroid production by isolated ovarian follicles J. Gen Comp Endocrinol 1987 67: 126—141

Effect of Gonadotropin Releasing Hormone Analogs/ Domperidone on Serum 17 β -Estradiol and Testosterone Consistency in Hemet Catfish (*Cranoglanis boudierius*)

ZHOU Li bin², LU Xiao chun¹, LIN Hao ran¹, YE Wei¹

(1. 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 Huizhou University Huizhou 516007, China

3. Panyu State-level Tilapia Breeding Center Guangzhou 511453 China)

Abstract Based on the radioimmunoassay (RIA), the variations of serum 17 β -Estradiol (E₂) and Testosterone (T) consistency during different gonadal development stage in hemet catfish (*Cranoglanis boudierius*), and the variations of serum E₂ and T consistency contents after injecting gonadotropin releasing hormone analogue (GnRH-A) / Domperidone (DOM) were studied. The results showed that in female E₂ consistency significantly increase in gonadal development stage, after that the serum E₂ consistency declined in sexually maturation stage, the serum E₂ consistency is lowest in regressed stage, while in male the serum E₂ consistency progressively increased during the development stage and kept in low consistency in maturation stage, after that the serum E₂ consistency slightly elevated. The serum T consistency in female and male increase in development stage, after that the serum T consistency decline. GnRH-A injection alone enhanced significantly the serum E₂ consistency of female and the serum T consistency of male in gonadal development stage. Domperidone (DOM) injection alone had no effect on the serum E₂ and T consistency of female and male, however GnRH-A in combination with DOM enhanced significantly the serum E₂ and T consistency in different gonadal development stage, and were especially obvious in development stage. The results were in accord with what injection of GnRH-A combination with DOM enhanced significantly GTH level.

Key words Hemet catfish (*Cranoglanis boudierius*), gonadotropin releasing hormone analogue, 17 β -Estradiol, testosterone