

注射 LHRHa、17 P 及其它药物组合诱导赤点石斑鱼排精研究^{*}

舒 琥¹, 刘晓春¹, 赵会宏², 林浩然¹

(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. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘 要: 在繁殖后期, 给精子排放量少的雄性赤点石斑鱼 *Epinephelus akaara* 注射促黄体素释放激素类似物 (LHRHa) 或生理盐水 (对照组), 6 d 后再次注射 LHRHa、17 α -羟基孕酮 (17P), LHRHa+17P, LHRHa+DOM 和生理盐水, 第 7 天重复注射, 24 h 后采集精液、血液。结果表明: 所有的实验组均能提高精液量, 其中 LHRHa+17P、LHRHa+DOM 和 17P 处理组精液量增加显著 (约为对照组的 3~5 倍), 但精子密度没有减少、精子活力没有降低。所有的实验组的血清 11-KT 含量降低, 而血清 T 的含量增加, 血清 E₂ 含量变化不大。精液量同 11-KT 含量水平之间呈负相关, 同 T 的含量水平呈正相关。

关键词: 赤点石斑鱼; 促黄体素释放激素类似物; 17 α -羟基孕酮; 注射; 精液量

中图分类号: S917 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2004) 06-0041-04

赤点石斑鱼 *Epinephelus akaara* 是热带亚热带暖水性近底层鱼类, 属鲈形目 Perciformes、鲈亚目 Percoidei、鲈科 Serranidae, 为名贵海水经济鱼类。是目前我国沿海重要的海水经济鱼类, 具有病害少, 生长快, 肉质鲜美、营养丰富等特点, 深受各地消费者的喜爱, 是很好的养殖对象。目前, 养殖所需的种苗主要依靠捕捞天然苗, 由于种苗供不应求, 赤点石斑鱼养殖受到极大的限制。从 20 世纪 70 年代开始, 国内外不少学者都致力于石斑鱼的人工繁殖研究, 多集中在石斑鱼的性转化方面^[1-3], 利用外源激素处理是控制养殖鱼类性腺发育成熟的重要可靠方法, 最常用的是利用促性腺激素释放激素 (GnRH_a) 的类似物刺激脑垂体释放促性腺激素 (GtH), 诱导精巢性类固醇激素的生成和精子的排放^[4,5]。我们在实际生产中发现雄性赤点石斑鱼排精量少且持续排精时间短, 影响受精质量。但有关诱导雄性成熟及提高精子质量方面的报道极少, 尤其是在赤点石斑鱼繁殖后期利用 LHRH-A、17 P 及其相关药物组合诱导雄性赤点石斑鱼排精的研究尚未见报道。

1 材料和方法

1.1 亲鱼来源

试验用鱼购于广东大亚湾水产试验中心附近海

域, 为网箱养殖的 3 龄雄性赤点石斑鱼, 共 25 尾, 饲养在大亚湾水产试验中心的网箱中。平均体质量 560.6 g (418~885 g), 平均体长 28.5 cm (24.5~34.5 cm)。海水盐度 32~33, 水温 (22~32 ℃), 自然光照。

1.2 实验设计

赤点石斑鱼的分组及激素的实验设计见表 1。

表 1 不同药物组合对赤点石斑鱼精液质量影响

Tab 1 Different treatment groups on milt quality of *E. akaara*

组别	样本数	剂量/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
对照 (saline)	5	20
LHRHa	5	20
LHRHa+DOM	5	20+5 000
LHRHa+17P	5	20+5 000
17P	5	5

实验前对照组鱼取血、精液。2003 年 7 月 2 日第 1 次注射。对照组鱼注射生理盐水, LHRHa 组、LHRHa+DOM 组以及 LHRHa+17P 组只注射 LHRHa, 17P 组不注射。7 月 7 日第 2 次注射。按上表所列药物组合进行注射, 7 月 8 日第 3 次注射。于次日, 2003 年 7 月 9 日采集精液、取血。血液 4 ℃静置 4~6 h, 12 000 r/min 离心 5 min 分离血清,

^{*} 收稿日期: 2004-01-05
基金项目: 国家海洋 863 资助项目 (2001AA621010); 国家自然科学基金资助项目 (39970586); 广东省科技计划资助项目 (A3050201, 2003C20308); 教育部科学技术研究重点资助项目 (02150) 资助
作者简介: 舒琥 (1965 年生), 男, 副教授, 博士, 现在广州大学生物系工作;
通讯联系人: 林浩然, 博士生导师, 院士, E-mail: ls32@zsu.edu.cn

储存于-20℃冰箱待测性类固醇激素。精液立即测定精子活力, 精液量, 精子密度。

1.3 精子活力的测定

雄性鱼在实验开始和处理(注射)后0、8 d用挤压法采集精液, 用去离子水洗净生殖孔, 再用干毛巾擦去生殖孔周围及体表的水分, 轻压腹部, 用一次性注射器将精液移入冰浴的1.5 mL离心管, 要求无污染。精液质量用精液量、精子活力和精液密度评价。精液量: 用体积(mL/kg)表示, 误差±0.01 mL; 精子活力: 以精子在自然海水33盐度中激活比例表示, 精子活力的计算参照(Chambeyron and Zohar)^[6]的方法稍加修改, 以精子激活比例表示, 即任意记数100个以上的精子, 根据活动精子占精子总数的比例将精子活力分为6个等级: I级, 活动精子比例<1%; II级, 活动精子比例为1%~25%; III级, 活动精子比例为25%~50%; IV级, 活动精子比例为50%~75%; V级, 活动精子比例为75%~90%; VI级, 活动精子比例为90%~100%。精液密度: 用人工精浆(100 mmol/L NaCl+13.4 mmol/L KCl+83.3 mmol/L+26.2 mmol/L NaHCO₃)将精液稀释1 000倍后, 用血球计数板计数, 再算出精液密度。取1 μL精液与1 mL稀释液(×1 000)混匀后, 取50 μL转移到载玻片上并立即在显微镜(×400)下观察计数。每次实验取5尾石斑鱼的精液, 每个精液样品重复观察3~5次, 取平均值。

1.4 性类固醇激素雌二醇、睾酮及11酮基睾酮的测定方法

血清性类固醇激素雌二醇(E₂)、睾酮(T)水平采用放射免疫测定方法(RIA)进行测定, 11酮基睾酮(11 KT)采用酶联免疫测定方法(EIA)进行测定。E₂、T放射免疫测定试剂盒购自中国北方生物技术所, 11 KT试剂盒购自美国化学试剂公司。E₂的测量灵敏度为2 pg/mL, 批内变异系数(CV)小于10%, 批间变异系数小于15%; T的测量灵敏度为0.02 ng/mL, 批内变异系数(CV)小于10%, 批间变异系数小于15%。11 KT的测量灵敏度为8 pg/mL, 批内变异系数(CV)小于11.4%, 批间变异系数小于27%。样品测定均采用双管平行。

1.5 数据处理

数据用平均值±标准差表示, 两个平均值之间的差异用Student's T检验, 2个以上平均值之间的差异用Duncan's新复极差法检验各组数据之间的差异, P<0.05认为差异显著, P<0.01认为差异极其显著。

2 结果

2.1 注射LHRHa、DOM、17P及其组合诱导在性腺发育后期的雄性赤点石斑鱼排精效果

如图1所示, 与对照组比较, 所有处理组鱼每kg体质量的精液量都有不同程度的升高。分别为LHRHa(0.55±0.05) mL/kg, LHRHa+DOM(0.9±0.1) mL/kg, LHRHa+17P(1.05±0.12) mL/kg和17P(0.85±0.05) mL/kg。均比对照组(0.18±0.01) mL/kg升高幅度大, 差异显著。但从诱导赤点石斑鱼精液量产生的角度看, LHRHa+17P、LHRHa+DOM和17P处理效果较好, 其中LHRHa+17P组效果最好。

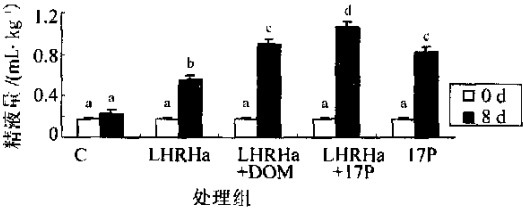


图1 不同处理组精液量的变化

Fig.1 Milt volume of different treatment groups

从图2可知各处理组鱼的精子密度和对照组的差异不显著, 精子密度从(4±0.12)×10⁹(LHRHa+DOM)到(7.3±0.25)×10⁹(MHRHa+17P)个精子/mL。所有组的精子密度平均为(5.286±0.15)×10⁹个/mL(IRHa+17P)个精子/mL。所有组的精子密度平均为5。如图3所示, 各处理组鱼的精子活力和对照组相比较也没显著差异P<0.05, 从0天的未处理组到经过各种不同药物处理后的第8天, 各组精子的活动能力均较好(多处在IV、V、VI级, 即活动精子多处在50%~90%之间)。

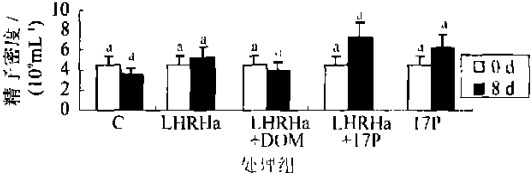


图2 不同处理组精子密度的变化

Fig.2 Sperm density of different treatment groups

2.2 注射LHRHa、DOM、17P及其组合对在性腺发育后期的雄性赤点石斑鱼血清T、E₂和11-KT水平的影响

如图4所示, 经过3次注射后, 所有药物处理组血清11 KT含量显著下降, 分别从(544.67±16.2) pg/mL降到LHRHa组的(351.25±15.5) pg/mL, LHRHa+DOM组的(281.43±4.98) pg/mL,

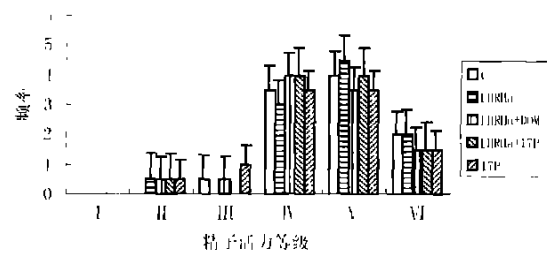


图 3 不同处理组精子活力的等级

Fig. 3 Sperm motility class of different treatment groups

LHRHa+17P 组的 (210.59 ± 2.79) pg/mL, 17P 组的 (259.9 ± 5.9) pg/mL。第 3 次注射后, 血清 11-KT 水平与精液量之间呈高度负相关, 相关系数为 -0.9681 。

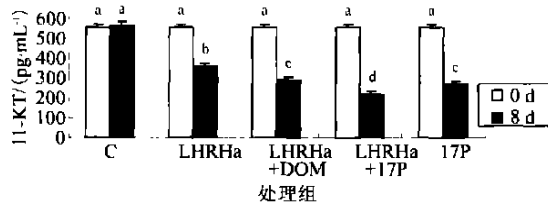


图 4 不同处理组血清 11-KT 含量的变化

Fig. 4 Serum 11-KT levels of different treatment groups

如图 5 所示, 所有实验组血清 T 含量均显著增加, 分别从 (0.1276 ± 0.011) ng/mL 增加到 LHRHa 组的 (0.758 ± 0.06) ng/mL, LHRHa+DOM 组的 (2.08 ± 0.21) ng/mL, LHRHa+17P 组的 (3.479 ± 0.32) ng/mL, 17P 组的 (2.62 ± 0.16) ng/mL。其中 LHRHa+17P 处理组增加非常明显, 与其他实验组差异显著。血清 T 水平与精液量之间呈高度正相关, 相关系数为 0.95 。

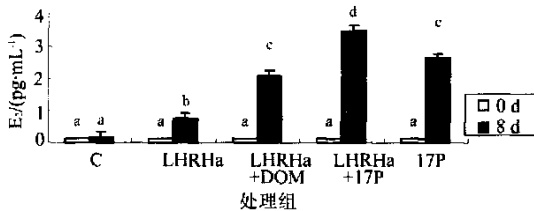


图 5 不同处理组血清 T 含量的变化

Fig. 5 Serum T levels of different treatment groups

如图 6 所示, 第 3 次注射后, 所有实验组血清 E_2 含量均增加, 但各组与对照组及各组之间没有显著差异。

各值表示为平均值 $\pm$ 标准误, 图中不同字母表示有显著差异, $P < 0.05$, Duncan's 检验, $n = 5$ 。

3 讨论

与其他硬骨鱼类一样, 赤点石斑鱼生殖活动受到下丘脑 GnRH、垂体 GtH 和性类固醇激素的调

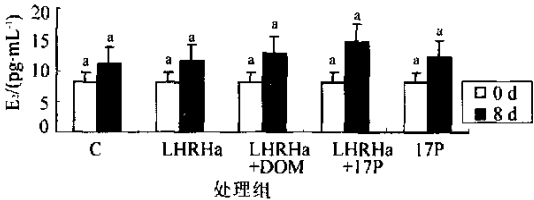


图 6 不同处理组血清 E_2 含量的变化

Fig. 6 Serum E_2 levels of different treatment groups

节。在许多硬骨鱼类中使用 LHRH 类似物及 GtH 能刺激精液生成。如鲑鱼, LHRHa 及 GtH 能有效提高精液量及精液生成速度^[7]。通过对雄性赤点石斑鱼注射 LHRHa、LHRHa+DOM、LHRHa+17P 和 17P 发现各组均能显著增加其精液量, 并能保持精子密度及精子活力不受影响, 其中以 LHRHa+17P 组的效果最佳。注射 LHRHa、LHRHa+DOM 组显著增加精液量可能是诱导 GtH 释放结果, 这与 Garcia^[8] 的结果一致。而 LHRHa+17P 和 17P 处理组能显著增加其精液量则是一个有趣的现象, 该结果说明增加外源 17P 的含量, 可以提高 17, 20 β P 的生成量, 辅以外源性 LHRHa 来刺激 2~3 龄赤点石斑鱼的精液量的提高。Henry 等^[9] 在大西洋鲑鱼的实验结果也表明, LHRHa 及 17P 组合的药物处理组鱼个体精液量与血浆 11-KT 含量呈负相关, 与血浆 17, 20 β P 呈正相关。已知雌性鲑鱼卵巢滤泡细胞的 20 β HSD 活性受 GtH 调节, 但 Sakai 等^[10] 报道, 用外源性 17P 离体孵育精巢碎片, 在孵育液中添加 GtH 并不增加 17, 20 β P 的生成量。说明精巢和卵巢 20 β -HSD 的调节方式可能不同, 并且 17, 20 β P 在血液中的清除速率可能很快^[11]。在本实验中也得到相似的结果, 在 LHRHa+17P 等处理组中血清 11-KT 含量与个体精液量之间呈负相关。这说明精液的生成可能不仅仅是依赖 17, 20 β P 的合成, GtH 也可能直接作用于性腺刺激性类固醇激素生成^[11]。本文中 LHRHa+17P 和 17P 处理组精液量与 11-KT 呈负相关的现象在阿马哥大麻哈鱼^[6]、日本鳗鲡^[12]、金鱼^[6]、大西洋鲑鱼^[9] 中亦有类似的研究结果。Barry 等^[13] 报道, 在体情况生理剂量的 17, 20 β P 并不会抑制循环中 11-KT 的量, 而离体孵育情况下孵育液中超过 300 ng/mL 的 17, 20 β P 就会抑制 11-KT 的生成。

对于在排精时 11-KT 含量下降目前尚无准确的结论。Henry 等^[9] 推测鲑鱼繁殖后期 11-KT 含量的下降是因为 GtH II 水平的升高引起 20 β HSD 活性增强 (17P 是 20 β HSD 的作用底物), 使 17P 转化为 17, 20 β P 的效率提高, 结果是能够转化为雄激素的 17P 的量下降, 而 17, 20 β P 生成的量增加, 最终导致 11-KT 含量的降低。因此, 精液的生成及控

制仍然是脑—垂体—性腺轴共同作用的结果。而不仅仅是性类固醇激素之间的作用。

关于注射 LHRHa、LHRHa + DOM、LHRHa + 17P 和 17P 后血清 T 含量显著高于对照组, 是由于这些药物刺激垂体 GtH 分泌, GtH 直接作用于精巢刺激性类固醇激素 T 生成。而血清 E₂ 含量与对照组比较变化不显著, 这是因为 E₂ 对精巢发育不起作用, 精巢内 E₂ 含量极低之故。雄性赤点石斑鱼血清中 T 和 E₂ 水平对注射药物的这些变化说明赤点石斑鱼 GtH 的释放受到下丘脑分泌的 GnRH 和多巴胺的双重调节。至于注射 LHRHa、LHRHa + DOM、LHRHa + 17P 和 17P 后对雄性赤点石斑鱼血清中 T、E₂ 及 11-KT 的影响的差异, 其内在原因还有待进一步研究。

结果说明在赤点石斑鱼养殖中, 17P 可作为一种潜在有效药物诱导雄性赤点石斑鱼精子排放。

参考文献:

- [1] 方永强, 林秋明, 齐襄, 等. 17 α -甲基睾酮对赤点石斑鱼性逆转的影响[J]. 水产学报, 1992 (16)2: 171—174.
- [2] 洪万树, 张其永, 公茂军, 等. 外源激素诱导赤点石斑鱼雄性化[J]. 台湾海峡, 1994 (13)4: 374—379.
- [3] KOU C M, TING Y Y, YEH S L. Induced sex reversal and spawning of blue-spotted grouper, *Epinephelus fario* [J]. Aquaculture, 1988, 74: 113—126.
- [4] NAGAHAMA Y. Endocrine control of gametogenesis[J]. Int J Dev Biol, 1994, 38, 217—229.
- [5] ZOHAR Y, MYLONAS C C. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes[J]. Aquaculture, 2001, 197: 99—136.

- [6] CHAMBEYRON F, ZOHAR Y. A diluent for sperm cryo-preservation of gilthead seabream, *Sparus aurata* [J]. Aquaculture, 1990, 90: 345—352.
- [7] UEDA H, KAMBEGAWA A, NAGAHAMA Y. Involvement of gonadotropin and steroid hormones in spermiation in the Amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*, and Goldfish, *Carassius auratus* [J]. Gen Comp Endocrinol, 1985, 59: 24—30.
- [8] GARCIA L M B. Spermation response of mature rabbitfish, *Siganus guttatus* Bloch, to luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRHa) injection [J]. Aquaculture, 1991, 97: 291—299.
- [9] KING H R, YOUNG G. Milt production by non-spermiating male Atlantic salmon (*Salmo salar*) after injection of a commercial gonadotropin releasing hormone analog preparation, 17 α hydroxyprogesterone or 17 α , 20 β dihydroxy-4-pregnen-3-one, alone or in combination [J]. Aquaculture, 2001(193): 179—195.
- [10] SAKAI N, UEDA H, SUZUKI N, et al. Steroid production by Amago salmon *Oncorhynchus rhodurus* testes at different developmental stages [J]. Gen Comp Endocrinol, 1989, 75: 231—240.
- [11] PANKHURST N W. Effects of gonadotropin releasing hormone analogue, human chorionic gonadotropin and gonadal steroids on milt volume in the New Zealand snapper, *Pagrus auratus* Sparidae [J]. Aquaculture, 1994, 125: 185—197.
- [12] MIURA T, YAMAUCHI K, TAKAHASHI H, et al. Involvement of steroid hormones in gonadotropin induced testicular maturation in male Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. Biomed Res, 1991, 124: 241—248.
- [13] BAYNES S M, SCOTT A P. Seasonal variations in parameters of milt production and in plasma concentration of sex steroids of male rainbow trout *Salmo gairdneri* [J]. Gen Comp Endocrinol, 1985, 57: 150—160.

Milt Production by Male Red Spotted Grouper (*Epinephelus akaara*) After Injection of LHRHa, 17P or DOM, Alone or in Combination

SHU Hu¹, LIU Xiao chun¹, ZHAO Hui hong², LIN Hao ran¹

- (1. Institute of Aquatic Economic Animal // Key Lab of GD for Improved Variety Reproduction of Aquatic Economic Animals, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;
2. School of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: At the end of the reproductive period, male Red Spotted Grouper (*Epinephelus akaara*) were injected with a commercial luteinizing hormone releasing hormone analog (LHRHa) preparation or vehicle (physiology saline). After 6 days, fish were additionally injected with 17 α hydroxyprogesterone (17P), domperidone (DOM) or vehicle. Injections were repeated on day 7, and after a further 24 h, milt was collected by syringe. Blood samples were also taken for analysis of steroid levels. The result suggested that all experimental groups increase in milt volume. Treatment with LHRHa in combination with 17P or DOM and 17P displayed a significant increase in milt volume (approximately 3~5 fold). And there were no significant different in sperm density and sperm motility. All experimental groups tended to result in lower blood plasma levels of 11 ketotestosterone (11-KT) and higher levels of testosterone (T) relative to saline-injected controls, while plasma E₂ levels were unaffected. Milt volume tended to be negatively correlated with 11-KT levels and be positively correlated with plasma T levels. These results demonstrate the effectiveness of LHRHa, 17P or DOM in combination in enhancing milt production in Red Spotted Grouper, without negatively affecting milt quality.

Key words: *Epinephelus akaara*; LHRHa; 17P; injection; milt volume