

文章编号: 0529-6579 (2000) S-0091-05

体外注射激素对中国对虾卵巢发育的影响^{*}

蔡生力, 杨丛海

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要: 研究了 4 种不同激素 (17 α - 羟孕酮、5- 羟色胺、前列腺素和保幼激素- III) 的体外注射对中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 卵巢发育的作用效果. 试验结果显示: 用 100 ng/g 浓度的 17 α - 羟孕酮和 5- 羟色胺注射亲虾对对虾卵巢的发育有明显的刺激作用, 生殖指数分别比对照组增加了 50.0% 和 44.7%. 而同样浓度的前列腺素和 JH- III 的体外注射作用不明显. 在相同条件下, 去眼柄对对虾卵巢的发育作用最明显, 生殖指数比对照组增加了 150%. 文中还讨论分析了几种激素的属性和对虾卵巢发育的作用机理.

关键词: 中国对虾 (*Penaeus chinensis*); 体外注射; 激素; 卵巢发育

中图分类号: S968.22; Q55 **文献标识码:** A

人工控制对虾卵巢发育、成熟、产卵是对虾育苗生产中的关键一环. 对虾卵巢发育受到由眼柄分泌的性腺抑制激素 GIH 的调控, 因此生产上, 大多通过切除眼柄来达到促使对虾卵巢发育、加快成熟产卵的目的. 但这种方法有较强的副作用, 由于破坏了对虾正常的内分泌生理机制, 对虾卵巢会由于失去抑制因素, 不断发育、不断产卵, 直到筋疲力尽. 在这种条件下所产之卵数量会越来越来少, 质量也越来越差. 因此全面系统弄清对虾内分泌生理机制, 从而达到使对虾在健康状态下自然成熟是一项值得重视和研究的工作.

目前国外已有学者通过体外注射各种外源激素促使甲壳动物成熟的试验, 取得了许多有效的结果^[1-6]. 所用的激素包括: 5- 羟色胺、孕酮、17 α - 羟孕酮、17 β - 雌二醇、前列腺素、保幼激素 (JH- III)、多巴胺等. 国内对甲壳动物内分泌学的研究较少, 激素对对虾亲体的体外注射研究至今尚未见报道. 本研究选择 17 α - 羟孕酮、5- 羟色胺、前列腺素和 JH- II 进行体外注射试验, 比较、分析这些激素对中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 卵巢发育的作用情况. 为进一步研究对虾繁殖内分泌调控机理和人工控制对虾苗种生产提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 亲 虾

1998 年 1 月从青岛市一家对虾育苗厂购入, 共 50 尾, 购买时越冬场水温 9 ~ 10 °C. 为前 1 年秋天收获的养殖越冬亲虾, 体长在 13 ~ 15 cm 之间, 卵巢发育处在 I ~ II 期, 外

^{*} 基金项目: 国家“攀登计划 B”资助项目 (PBD6-2-1)

收稿日期: 1999-09-15

观半透明，没有明显的卵巢轮廓。解剖看，可见卵巢半透明，呈灰白色，卵母细胞直径约为 40~50 μm ，看不到卵黄粒。核内核仁很多，分布于核膜内缘，处于核仁周边期。

将亲虾暂养在 25 m^3 水泥池，3 d 后水温调至 10~11 $^{\circ}\text{C}$ 。在试验开始前，随机取 6 尾亲虾解剖取出卵巢称量，计算其平均生殖指数 GSI ($\text{GSI} = (\text{卵巢质量} / \text{体质量}) \times 100$)。试验分成 6 个组，1~4 组为注射激素组，第 5 组为去除眼柄组，第 6 组为对照组（表 1）。准备 6 个 0.5 m^3 黑色玻璃纤维钢桶，每桶放养随机选取的亲虾 6 尾，连续充气。试验共进行 20 d，结束时，解剖所有对虾卵巢，称量并计算 GSI。试验前 10 d 水温控制在 11~13 $^{\circ}\text{C}$ ，后 10 d 控制在 13~15 $^{\circ}\text{C}$ 。每天换水 50%，早、晚各投饵 1 次，饵料为新鲜蛤肉。

表 1 不同激素注射对虾试验分组情况

组别	17 α -羟孕酮	5-羟色胺	JH-III	前列腺素	去眼柄	对照
溶剂	乙醇	乙醇	乙醇	生理盐水		乙醇
注射剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	2 $\times$ 0.01	2 $\times$ 0.01	2 $\times$ 0.01	2 $\times$ 0.01		2 $\times$ 0.01

1.2 激素配制及注射

5-羟色胺、17 α -羟孕酮，JH-III 购于美国 Sigma 公司，前列腺素-E 购于青岛医药商店。取上述激素 10 mg 溶解于 10 mL 100% 的乙醇中，（前列腺素溶于生理盐水中），梯度稀释至 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，当天使用。激素共注射 2 次，试验第 1 天 1 次，第 10 天加强注射 1 次，注射部位在腹部第 6 节。根据亲虾大小，每尾每次注射 0.2~0.3 mL 不等，使亲虾体内激素浓度达到 10 ng/g 组织。各组亲虾所注射药品、用量、配制以及其它处理见表 1。去除眼柄用镊烫法^[7]。

1.3 卵巢发育分期

卵巢发育情况在实验第 1 天、第 10 天和第 20 天通过外观观察记录。参照 Yano 等将卵巢发育分成 V 期，具体为：

- I 卵巢透明，体外观察不到卵巢轮廓；
- II 沿背部中轴线从体外能隐约看见卵巢轮廓，线状，半透明；
- III 卵巢明显可见，变粗大，不透明，颜色略显浅绿色或灰绿色；
- IV 体外观察巢极饱满，位于头胸甲和第 1 腹节两侧的卵巢向腹面下垂，颜色呈褐绿色或暗红色。

1.4 差异显著性检验

差异显著性检验用 *t* 检验法。

2 结 果

通过 20 d 的体外注射激素试验，结果如表 2 所示。

从表 2 可见，在这 4 种所选激素中，17 α -羟孕酮和 5-羟色胺对虾卵巢发育有显著作用，在试验第 20 天，有 1/2 的亲虾已发育至第 IV 期，其余也都进入第 III 期，其生殖指数分别比对照组增加了 50.0% 和 44.7%。而 JH-III 和前列腺素的作用较小，在试验第 20 天，生殖指数只增加了 1.8% 和 7.9%，与对照组类似，大多数亲虾卵巢发育仍处于第 II~III 期，仅少数发育至第 IV 期。

表 2 不同激素体外注射对中国对虾卵巢发育的作用

处 理 方 法	发 育 情 况			性腺指数	
	第 1 天	第 10 天	第 20 天	第 1 天	第 20 天
17 α -羟孕酮	5 II 1 I	2 III 3 II 1 D ¹⁾	3 IV 2 III	2.0 $\pm$ 0.5	6.7 $\pm$ 1.1 ^{* 2)}
5- α 羟色胺	4 II 2 I	2 III 4 II	2 IV 4 III	2.0 $\pm$ 0.5	6.5 $\pm$ 1.2 [*]
JH- III	6 II	1 III 4 II 1 D	1 IV 4 III 1 II	2.0 $\pm$ 0.5	4.4 $\pm$ 1.3
前列腺素	4 II 2 I	1 III 3 II 2 D	2 IV 1 III 2 II	2.0 $\pm$ 0.5	4.1 $\pm$ 1.5
去眼柄	5 II 1 I	4 III 1 II 1 D	2 V (1 S) ³⁾ 3 IV	2.0 $\pm$ 0.5	9.5 $\pm$ 2.0 [*]
对 照	5 II 1 I	1 III 5 II	1 IV 3 III 2 II	2.0 $\pm$ 0.5	3.8 $\pm$ 0.9

1) D 表示死亡虾数; 2) * 表示相对于对照组差异显著; 3) S 表示产卵虾数

值得注意的是去眼柄组，对虾卵巢发育最快，至试验第 20 天生殖指数已达 9.5，比对照组增加了 150%。已有 2 尾亲虾发育到第 V 期（其中 1 尾已于当天产卵约 10 万粒，孵化率达 70%），另外 3 尾也已发育至第四期。

此次试验由于将刚买入的新虾暂养了 3 d，淘汰了部分不健康虾，另外去除眼柄用的是镊烫法，因此整个试验对虾成活率都较高，保证了试验的顺利进行。

3 讨 论

本研究用几种不同激素注射对虾亲体并对其卵巢发育情况进行观察。研究结果证明，用 10 ng/g 浓度的 17 α -羟孕酮和 5- α 羟色胺注射中国对虾亲体后对卵巢发育有显著的作用，生殖的指数分别比对照组增加了 50%和 44.7%，而相同浓度的前列腺素和 JH- II却作用不显著，仅比对照组增加了 15.8%和 7.9%。说明在适宜的浓度条件下，某些相关激素的体外注射的确具有刺激对虾卵巢发育的作用。

孕酮是许多类固醇激素包括雌二醇的前体，而雌二醇能诱导两栖动物、鱼类等卵黄的生成。孕酮或雌二醇在甲壳动物体内的存在已有不少报道。Teshima 等证实蟹 (*Portunus trituberculatus*) 的卵巢有将孕酮转化为 17 α -羟孕酮、睾酮、脱氧皮质酮等。有关孕酮对于甲壳动物的性腺发育具有刺激作用已有不少作者通过体外注射或体外培养得以证实。Yano 用 17 α -羟孕酮注射日本对虾 48 h 后发现，血清中的卵黄蛋白原浓度比对照组高 3 倍以上。此外，他还用孕酮注射刀额新对虾 (*Metapenaeus ensis*)，结果显示，试验组亲虾的卵巢发育明显比对照组快。Tsukimura 在体外培养南美白对虾 (*P. vannamei*) 卵巢细胞时发现，17 α -羟孕酮明显刺激卵母细胞直径的增大。17 α -羟孕酮相似的作用在罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 的卵母细胞体外培养时也得到证实^[8]。另外还用不同浓度的孕酮培养中国对虾卵巢发现，在对虾卵巢组织培养基中添加 2 $\times 10^{-6}$ ~2 $\times 10^{-8}$ μ g/mL 的 17 α -羟孕酮溶液，对对虾卵巢细胞分生和卵母细胞直径增大具有显著或极显著的刺激作用，在相同培养时间内，试验组卵母细胞直径比对照组增大 30%~50%。随着激素浓度的增加，卵原细胞分生和卵母细胞直径增长加快。经过 1 周左右时间的体外培养后，试验组的平均卵母细胞直径分别为 (85.1 $\pm$ 12.4)，(102.7 $\pm$ 11.5)和 (131.4 $\pm$ 12.2) μ m，而对照组仅为 (67.7 $\pm$ 9.2) μ m^①。

① CAI Sheng-li. Effect of 17 α -hydroxyprogesterone on *in vitro* culture of oocytes of shrimp *Penaeus chinensis*. In: International symposium on progress and prospect of marine biotechnology. 1998. 44.

5-羟色胺又称血清动素(seotonin), 源自白胺酸, 属于生物胺的一种. 在甲壳动物体内它以神经激素和神经调控物质的角色参与多项生理反应, 如调控甲壳类促高糖激素(CHH)、蜕壳抑制激素(MIH)、黑色素分散激素(BPDH)和红色素分散激素(RPDH)等神经激素的分泌^[9]. Richardson 还发现 5-羟色胺具有促进甲壳类性腺发育的功能. 用 $1.25 \times 10^{-9} \sim 1.25 \times 10^{-7}$ mol/尾的 5-羟色胺注射异钳蟹(*Uca pulgilator*)后, 无论卵巢指数还是卵子直径都明显比对照组大. Kulkarni 用 15 ng/g 的 5-羟色胺注射克氏螯虾(*Procambarus clarkii*), 卵巢指数和卵径分别比对照组增加了 52.86% 和 56.56%^[4]. 同时还指出 5-羟色胺对卵巢的促进作用是间接的, 当把 5-羟色胺加入体外培养液与卵巢组织共同进行体外培养, 卵巢发育与对照并无多大差异, 因此, 可推测 5-羟色胺的作用靶器官是胸、脑神经组织, 促使他们分泌卵黄生成刺激素(VSH). 我们此次试验结果也证实 10 mg/g 的 5-羟色胺体外注射能明显促进中国对虾卵巢的发育, 而在此之前的一次卵巢体外培养实验中, 也发现 5-羟色胺对对虾卵巢的体外培养作用与对照组没有明显差异, 远没有 17α -羟孕酮的作用明显. 这些结果也许可以更进一步说明 5-羟色胺对甲壳动物卵巢发育的作用是间接的.

前列腺素是一类脂肪酸(二十碳四烯酸)的衍生物, JH-III 是一类萜烯类物质, 目前有不少研究发现这两类物质与甲壳动物的繁殖相关. 但本次实验发现这 2 类物质体外注射对对虾卵巢发育作用不明显, 其原因较复杂, 除激素本身功能不同外, 还可能与激素注射剂量不当及试验条件不适等因素有关. 此次实验所用剂量参考了国内外其他者的些数据, 并根据我们所检测的中国对虾体内某些激素的含量所定, 均采用 10 ng/g 组织的剂量. 由于实验条件所限, 没能进一步进行各种激素不同浓度的注射实验, 因此本次实验结果仍有一定的局限性. 另外将亲虾养殖在一个 0.5 m^3 的纤维玻璃钢桶中, 对它们的发育也有较大的影响, 远不如在大水泥池更适宜. 与稍后进行的大水体用于育苗生产的亲虾相比, 水泥池中的亲虾发育比玻璃钢桶中对照组的亲虾发育明显快.

虽然中国对虾育苗一般不用去除眼柄, 但去除眼柄对中国对虾卵巢发育有显著影响这一结果国内已有报道^[7]. 本次试验再一次证实了注射 17α -羟孕酮和 5-羟色胺, 在试验第 20 天, 所有存活对虾卵巢发育均很饱满, 并且已有 1 尾亲虾产卵. 目前我们仅知道眼柄性腺抑制激素(GIH), 使卵巢发育受到抑制, 但有关 GIH 的分子结构, 在虾体内的浓度变化, 调节因子以及与之相拮抗的物质等问题仍待进一步研究探讨. 只有解决了上述问题并真正弄清对虾其他一些内分泌学机理, 对虾繁殖才有可能象许多鱼类一样在人工控制下进行.

致谢: 感谢青岛流亭镇西后楼村对虾育苗厂的大力协助. 本实验室刘桂珍女士参加了本次研究, 同时致谢.

参考文献:

- [1] CHAN H H, LIM S H. Effect of progesterone on the ovary maturation of the white prawn *Penaeus merguensis* [A]. In: Aquaculture international congress and exposition British Columbia[C]. Canada, 1988. 63.
- [2] GHOSH D, RAY A K. Evidence for physiologic responses to estrogen in freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. J Inland Fish Soc India, 1992, 24: 15~21.
- [3] GHOSH D, RAY A K. 17β -Hydroxysteroid dehydrogenase activity of ovary and hepatopancreas of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* relation to ovarian condition and estrogen treatment [J]. Gen Comp Endocrinol, 1993,

89: 248 ~ 254.

- [4] KULKARNI G K, NAGABHUSHANAM R, AMALDOSS G et al. 5-Hydroxytryptamine stimulation of the ovary in the crayfish, *Procambarus clarkii* [J] . Am Zool, 1991, 31: 115.
- [5] NAGABHUSHANAM R, JOSHI P K, SARAJINI T. Effect of exogenous steroids on reproduction in *Parapenaeopsis stylifera* [A] . In: NATARAFAN P, SURYANARAYANAN H, AZIS P K A. Advance in aquatic biology and fisheries [C] . Prof N, Balakrishnan, Nbaiakrishnan, Nair Felicitation Volume, 1987. 201 ~ 206.
- [6] SPAZIANI E P, HINSCH G W, EDWARDS S C, et al. Possible role of prostaglandin F_{2α} in vitellogenesis in the crayfish (*Procambarus paeninsulae*) [J] . Am Zool, 1991, 31: 23
- [7] 梁美园, 张乃禹, 曹登宫, 等. 摘除眼柄诱导中国对虾性腺成熟和提前产卵的初步试验[J] . 海洋与湖沼, 1983, 14 (2): 138 ~ 146.
- [8] 赵维信, 贾江, 安苗. 外源激素和眼柄提取物对罗氏沼虾卵母细胞的离体诱导作用[J] . 上海水产大学学报, 1996, 5 (4): 221 ~ 225.
- [9] FINGERMAN M, NAGABHUSHANAM R, SARAJINI R, et al. Biogenic amines in crustacean: Identification, localization and roles [J] . J Crust Biol, 1994, 14: 413 ~ 437.

Induced Ovarian Maturation of *Penaeus chinensis* by Injection of Four Kinds of Hormones

CAI Sheng-li^{*}, YANG Cong-hai

Abstract: Four kinds of hormones (17 α -hydroxyprogesterone, 5-hydroxytryptamine, prostaglandin E and juvenile hormone-III) were injected into the parent shrimp *Penaeus chinensis* with a dose of 10 ng/g for stimulation of ovarian development. The results showed that 17 α -hydroxyprogesterone and 5-hydroxytryptamine had significant stimulation of the shrimp ovary, and the gonad somatic index (GSI) increased by 50.0% and 44.7% respectively over the control group. However, prostaglandin E and juvenile hormone-III showed insignificant effects on the shrimp ovarian development. In the eyestalk remove group, the ovary of the parent shrimp developed most rapidly, and the GSI increased by 150% and 50% over the control group and the hormone injected groups.

Keywords: *Penaeus chinensis*; hormone; ovarian maturation; injection

^{*} Yellow Sea Fisheries Research Institute, CAFS, Qingdao 266071, China