

鲮鱼 (*Cirrhina molitorella*) 性腺发育过程中血清旦白变化规律的研究

张素雅 刘学高 童青松 苑省三*
(生物学系)

自1975年以来,将人工合成的下丘脑促黄体释放激素(LRH)及其类似物,应用于家鱼人工繁殖,取得初步效果。但它在鲮鱼催产中常表现不稳定,试用剂量也很不一致,可以从1微克到1,000微克/尾。分析其催产效果不稳定的原因可能有:(1)个体性腺发育不一,催产时性腺成熟度不相适应;(2)不同性腺发育阶段,垂体内对LRH的敏感性不同,因此,对外源性激素,垂体分泌LH的反应性不同;(3)LRH催产剂量不适,过小达不到催产效果,过大反而有抑制排卵的作用;(4)鱼类机体内抗激素的产生以及和其他抗原引起的抗体交叉反应的影响等等。总的来说,亲鱼性腺发育情况是个关键。掌握亲鱼成熟度的变化规律,适时催产,减少盲目性,提高催产率,是寻求解决这一问题的途径之一。因此,了解卵母细胞发育与相应有关的生理指标变化,很有必要。

关于鲮鱼生物学的研究,广西壮族自治区水产研究所曾对其食性、年龄与生长、繁殖等进行调查研究^[1],李广有和陈奋昌1965年曾进行过鲮鱼在池养环境下的性腺周年变化的研究^[2]等。但是,关于鲮鱼性腺发育过程中的物质代谢,以及应用物质代谢的一些生理指标来推断性腺成熟度,尚未见有报导。在真骨鱼类性腺发育的过程中,随着生殖细胞的成熟,需要大量营养物质的积累,以利生殖细胞的发育及卵黄的积累^[2,6,7,17]。关于卵黄的形成问题,曾提出过三种可能途径^[20],其中血液循环在物质转运中起着重要作用。随着电泳技术的发展,科学工作者开始利用血液中有成分的变化作为生理指标,研究鱼类营养运输线,寻找建造卵黄物质的材料^[4,12,15,15]。于六十年代发展起来的聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳技术,具有快速、微量、分辨率高的优点,对进一步研究血浆蛋白成分变化与性腺发育的关系,创造了有利的技术条件。为了探讨鲮鱼人工催产效果不稳定的原因,性腺成熟度与催产效果的关系,以及性腺成熟度的客观指标,我们采用这一技术,探讨了性腺发

* 童青松、苑省三是1974级学员。

育过程中血清蛋白变化的规律。

材 料 和 方 法

实验自1977年3月14日至6月15日，历时3个月。实验用鱼部分取自本校农场，部分在顺德县桂洲和勒流公社鱼苗场获得，共51尾(其中包括性腺未分化6尾；成熟雄性9尾；成熟雌性36尾)。采用相同实验条件下的正常家兔血清园盘电泳图谱作对照。不同成熟期分别取样分析，一律心脏抽血，用3500转/分离心5分钟分离血清。血清当天分析置冰壶保存，隔日则置冰箱保存。取血后将鱼解剖，称体重与性腺重，计算成熟系数(GSL%)。部分实验用鱼成熟情况见表1。卵巢区分时相，基本按梅因氏(1963)所提出一般真骨鱼类卵母细胞区分法。

血清蛋白电泳分析参考王兴娟，马立人、Maurer等介绍的方法^(3,10)。我们采用凝胶浓度为7%，丙烯酰胺占98%、亚甲基双丙烯酰胺占2%，血清1:1稀释，每

表1 部分实验鱼成熟情况

编号	取样日期	性别	成熟期	体重 (克)	性腺重 (克)	成熟系数 性腺重/体重%	备 注
1	77年3月14日	未分化	—				未计算成熟系数
2	23日	雌性	Ⅱ				
3	23日	雄性	Ⅱ				
6	4月13日	雌性	Ⅳ初	600	30.0	5.4	
7	13日	雌性	Ⅳ中	500	60.1	12.0	
11	19日	未分化	—	200			未计算成熟系数
17	28日	雌性	Ⅳ中	600	43.6	7.2	
20	28日	雄性	Ⅳ末				轻压腹部有精液流出
27	5月18日	雌性	Ⅴ				
29	26日	雌性	Ⅴ	550	14.6	2.7	产后12小时取样
32	26日	雌性	Ⅴ	725	101.0	13.9	难产12小时取样
34	27日	雌性	Ⅴ	550	13.0	2.4	产后28小时取样
36	27日	雌性	Ⅳ中	600	55.0	9.2	产后培育15天左右
37	6月8日	雌性	Ⅴ	750	10.0	1.3	产后培育15天左右
38	8日	雌性	Ⅳ末	525	59.0	11.2	卵巢仍处退化阶段。 约1%退化卵
39	8日	雌性	Ⅳ末	525	88.2	16.8	

管点样25微升，以4毫安/管，电泳45—50分钟，电泳缓冲液用0.025M (PH9.0) 硼酸缓冲液，蛋白染料为氨基黑10B，7%醋酸脱色。脂蛋白染色采用 Nanayan 等方法^[11]。

结 果

一、正常鲮鱼血清聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳图谱

正常鲮鱼血清蛋白电泳图谱与正常兔血清圆盘电泳图谱相比较，其电泳后的区带较相似，命名参照正常人血清聚丙烯酰胺凝胶电泳谱相应部位，大约可分为，白前蛋白(P)、白蛋白(A)、 α_1 (α -球蛋白之一部分)、 α_2 (α -球蛋白之一部分)、 β (β -球蛋白)、 T_2 (转铁蛋白)、HP(触珠蛋白)、S β (慢 β -脂蛋白)、S α (慢 α -球蛋白)、 γ (丙种球蛋白)等区带，此外鲮鱼血清蛋白还有些特有区带未确定它的成份。见图1及图版1。正常鲮鱼和家兔均可见共有的14条区带。鲮鱼血清蛋白的明显特征，是白前蛋白不仅量多并且成份复杂，显示2—3条带，而家兔的白前蛋白含量很少，只有一条着色极淡的带，这可能是不同种间或个体发育的不同阶段所存在的差异。另外， α_1 区带是随性腺发育不同阶段而变化，这在下面将详细叙述。

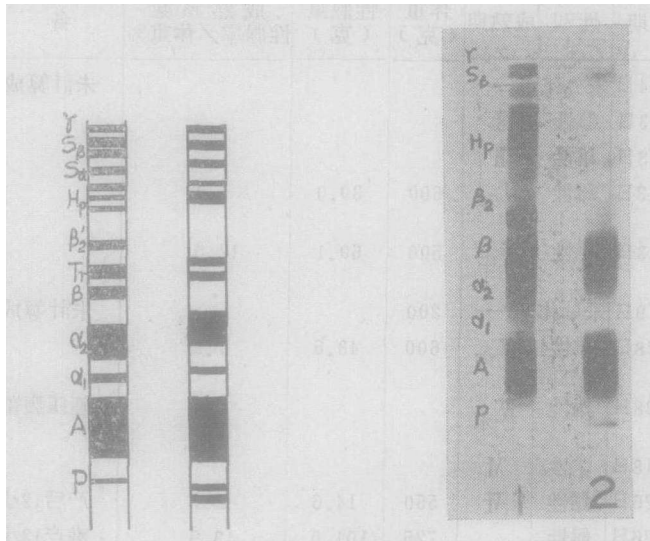


图1 正常兔(左)、正常鲮鱼(右) 血清蛋白电泳区带
图版1 正常兔(左)和正常鲮鱼(右) 血清蛋白图谱

在我们的实验条件下，用苏丹黑B染脂蛋白，白蛋白区和 α_2 区表现着色，这与有关报导^[10] α -脂蛋白和 β -脂蛋白分别存在这两区是相符的。

二、性腺发育与血清蛋白区带的关系

鲮鱼的性腺发育，从4月初开始，成熟系数(GSI%)直线上升，至6月15日结

束实验时为止,成熟系数没有下降的迹象,这与李广有等人对鲮鱼的成熟系数变化研究相一致⁽²⁾。圆盘电泳分析血清蛋白成分,发现随成熟度的上升,区带也发生变化;不同性别,血清蛋白圆盘电泳图谱也存在着差异。从图2和图版2可以看出,性腺未分化的雌性个体和成熟的雄性个体,在图谱显示的区带数目一样,但二者与雌性成熟个体比较,分别少一个区带即 α_1 区带。我们发现,在雌性成熟个体中,随性腺发育不同时期,血清蛋白电泳图谱有规律性的变化见图3和图版3所示,Ⅳ初 α_1 和 α_2 两条区带分开,达Ⅳ中 α_1 区带逐渐靠近 α_2 区带而消失,而 α_2 区带相应变浓;当性腺发育良好、卵母细胞基本长足(Ⅳ末),而在 α_2 位上又出现了一个新的区带,暂名为FSPP-b(见讨论)。产后包括难产后FSPP-b区还存在一定时间;但在卵母细胞处于退化阶段(包括未产和产后), α_1 区开始重出现,暂名为FSPP-a。

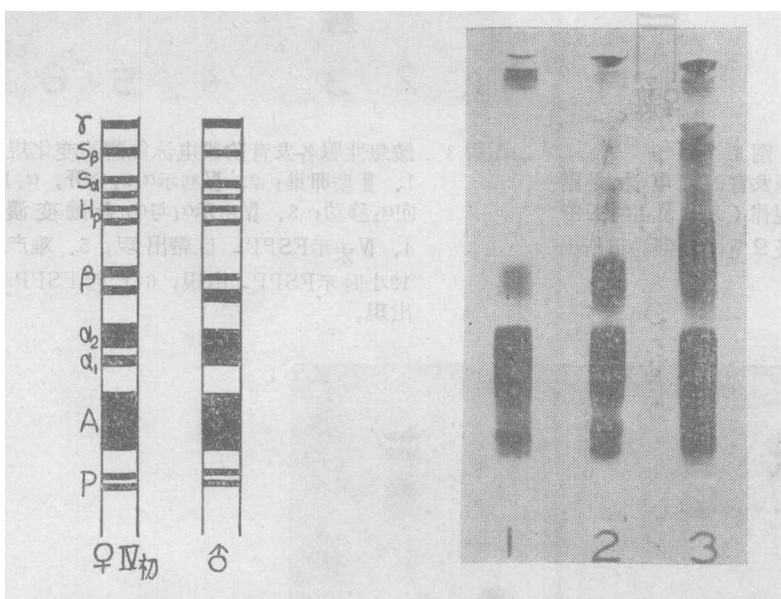


图 2 鲮鱼电泳区带的雌雄差异 (示雌性Ⅳ初多 α_1 区带)

图版 2 鲮鱼血清蛋白电泳区带的雌雄差异。1、性腺未分化♀鱼 2、性成熟♂鱼 3、性成熟♀鱼(示多一条 α_1 区带)

三、性腺发育与脂蛋白关系

在成熟的个体中(图版4),除个体差异外, α -脂蛋白(在白蛋白区)一般维持在相等水平,产后约12小时开始减少,24小时后迅速下降, α -脂蛋白处于极低水平。产后培育半月左右,卵巢仍处于退化吸收阶段。经产后培育,性腺达Ⅳ时, α -脂蛋白又上升。难产的鱼和产后变化基本一致。

β -脂蛋白的变化与性腺发育相适应,从图版2及3可看出,当进入成熟期, α_2 区带是较浓的,而在产后的鱼, α_2 区带着色较淡,这表明是 β -脂蛋白的减少。

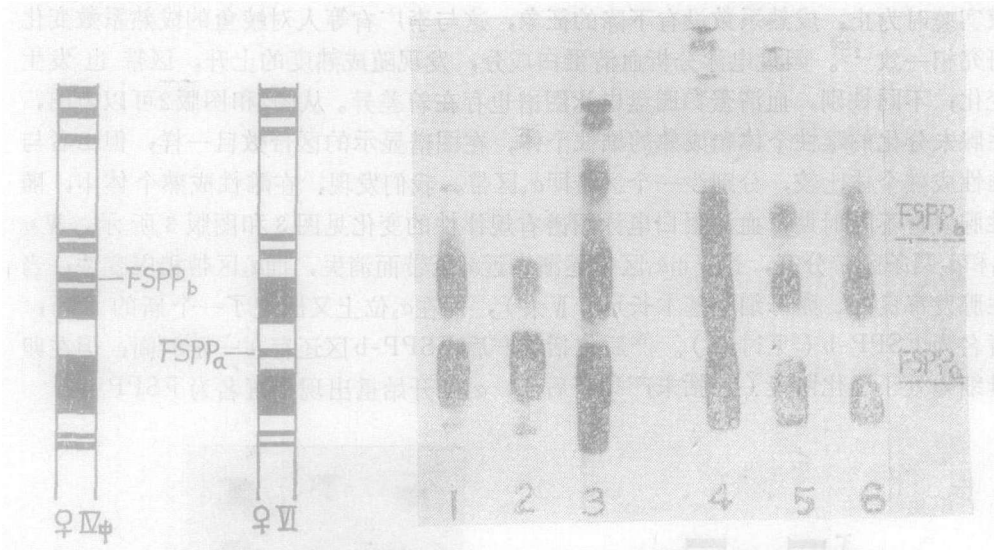
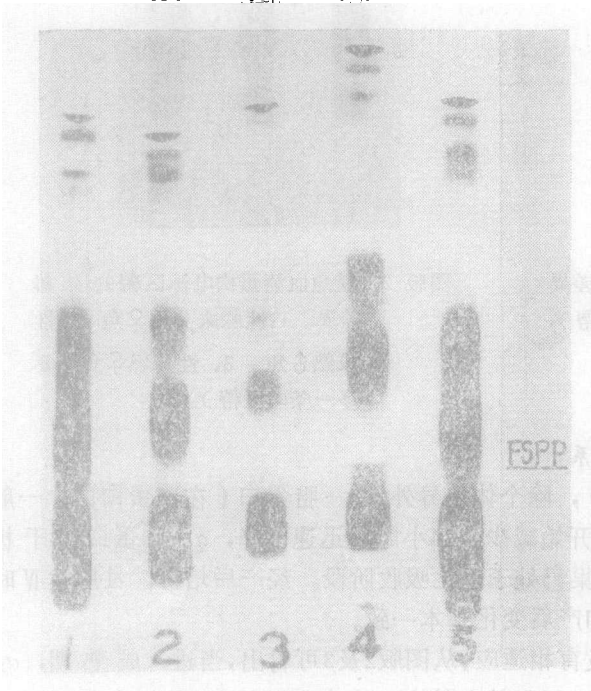


图3 鮫魚性腺发育时期电泳图谱的变化规律(看表1中 α 区带的消失及 β 区带的重新出现)

图版3 鮫魚性腺各发育阶段电泳图谱的变化规律
1、Ⅱ期卵巢；2、Ⅲ初示 α_1 分开， α_1 将向 α_2 移动；3、Ⅳ中 α_1 与 α_2 合并变淡；4、Ⅳ末示FSPP $_{\alpha}$ 区带出现；5、难产后12小时示FSPP $_{\alpha}$ 出现；6、产后FSPP $_{\alpha}$ 出现。



图版4

鮫魚性腺各发育阶段血清蛋白的变化 1、发育正常(Ⅳ末)；2、产后16小时；3、产后24小时；4、产后半个月卵巢退化；5、产后经培育，卵巢达Ⅳ中。

实验过程中,自5月中旬后取样分析,相当于家兔的触珠蛋白位的连续三条区带消失,是否与性腺或环境(季节变化)等有关,需进一步观察和分析。其他区带变化不大。

讨 论

根据聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳分析,鲢鱼血清蛋白变化与性腺发育有关,随着性腺的成熟, α_1 区带消失, α_2 区带上出现一新的区带。Katsumi等^[12]在淀粉凝胶电泳板上同样发现雌性成熟香鱼出现两种特殊血浆蛋白,称为雌性特殊血浆蛋白(FSPP-)。用雌激素刺激性腺未分化和雄性香鱼也可产生FSPP,用雌激素处理两栖、爬行甚至人类都得到相似结果,称为 x_1 和 x_2 组份^[14]。湖北水生生物研究所鲤鱼遗传育种小组^[9],利用聚丙烯酰胺圆盘电泳方法,对雌性兴国红鲤进行血清蛋白分析,根据区带的多少,将同种分为两种型号,即A型(15条蛋白带),B型(16条蛋白带),从B型图谱分析,多的那一区带和我们所发现的成熟良好、卵母细胞基本长足的鲢鱼 α_2 区带上出现的新区带相同。我们认为这个区带是不稳定的,在Ⅲ期卵巢(因未取到Ⅱ期卵巢)和未成熟的个体中没有发现,因此,所谓A型、B型电泳谱,可能就是由于性腺发育过程中,营养物质的转运在血液中的反映。我们认为 α_1 和 α_2 区带上的新出现区带可能与Katsumi等在香鱼所观察到的两种雌性特殊血浆蛋白(FSPP-a, FSPP-b)相当。

α_1 (FSPP-a)向 α_2 方向转移的现象,在卵母细胞进入Ⅳ初的不同成熟度的个体,得到像拍摄电影一样的连续图像,卵细胞达Ⅳ中,两区带基本完全合拢。关于此时鲢鱼卵细胞的生化组成,虽尚未见文献报导,但在其他鱼类例如白鲢^[4,5,6,7,8]和底鲮^[10]则有这方面的研究,王精豹等关于白鲢血浆蛋白组成的变动以及与卵黄形成的关系等的研究,对我们了解鲢鱼卵黄积累及卵细胞的生化组成提供了理论基础。鲢鱼性腺发育过程中血清蛋白的变化,和对其他鱼类卵巢的组织学和化学组成研究结果相一致。我们认为 α_1 区带为 β -脂蛋白和 α_2 -球蛋白部分的变化主要是 β -脂蛋白的活动。在新陈代谢中, β -脂蛋白的生理功能极为重要。Scanu等指出, β -脂蛋白已知可以作为大约17种酶的载体。例如琥珀酸脱氢酶、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、氨基酸转移酶、脂酶等^[13]。这些酶有的与卵细胞发育关系极大,如脂酶颗粒较多集中在小生长期的卵细胞核的周围,形成围核的脂酶环,当液泡出现,而卵黄尚未出现时围核脂酶环更加浓密;卵黄开始积累时,脂酶活性达高峰,细胞质及卵黄之间以及滤泡细胞充满了大量的脂酶颗粒。这与血液中 β -脂蛋白在卵母细胞进入大生长期增加相适应。这些酶分子并非都在血液中推进生化反应,酶和 β -脂蛋白在循环系统中形成不稳定的、非活性的复合物。进入大生长时期的卵母细胞,需要从有关的组织运输蛋白质、脂酶与其他元素等大量营养物质,因此,我们认为 β -脂蛋白此时增加,主要作为酶的载体出现。当血液流入一定的组织和器官,释

放出酶分子,参与营养物质的代谢,供给建造卵黄物质的材料。这可能与人类在妊娠后期,由于胎儿代谢率加强,需要的营养物质增多, β -脂蛋白增高有类似的意义。

关于 α -脂蛋白的生理作用,也即它在卵巢发育中的地位,有迹象表明它可能供应性腺发育的脂类物质。在人类, α -脂蛋白主要为磷脂类^[21],而在鲮鱼从性腺发育Ⅲ期到排卵期, α -脂蛋白在卵细胞发育Ⅵ末略有减少,产卵16小时内下降不大明显,产后24小时后都显著减少,达到最低水平。可能是排卵过程中卵巢需要能量与水份,而这些大都要依靠血液来转运。同时,产后亲鱼摄食量减少,能量的来源主要靠燃烧脂类,因而导致 α -脂蛋白下降,与此同时也伴有其它蛋白质(包括 β -脂蛋白)的下降。总之,整个血清蛋白的下降,与大量营养消耗,血液水份增加以及血清蛋白减少有关。上述现象在产后半月卵巢仍处于退化吸收的个体同样出现,血液蛋白质成份的下降,特别 α -脂蛋白仍维持一低水平,其机理可能不外乎前述原因。一旦退化吸收阶段结束,机体恢复了正常的代谢,性腺开始新的发育周期, α -脂蛋白上升,达到正常水平,特别在产后培育一段时间,卵细胞进入大生长期更为明显,这与卵细胞需要营养物质的积累是同步的。在雄性的个体未发现这样大的变化,因为精细胞发育不需要象卵细胞那样积累大量供胚胎发育的营养物质,所以 α -脂蛋白基本维持相等水平。在生产实践中,对雌性亲鱼精养,越冬前投喂富有脂肪的饵料,在开春后鳞鱼卵细胞进入大生长期,卵黄开始积累时,仍保证投给一定量的精料。而雄性亲鱼却没有这么严格的培育程序,是符合鲮鱼发育生理规律的。

关于FSPP-a和FSPP-b两种成份及来源,Katsumi等利用免疫电泳和免疫扩散方法,在香鱼中发现卵巢里存在着和这两种组织具有同一抗原性物质^[12],为进一步找出它合成的部位,对肝组织进行了研究,指出肝脏很可能就是它合成的部位^[13]。再用雌激素处理雄性和未成熟雌性个体,都引起和成熟雌性同样的生理现象。从而证明,卵黄物质至少一部份是由另外组织、器官合成由血液运往卵巢,这些物质的合成,都受雌激素的调节。

综上所述,血液组分作为研究鱼类性成熟度的变化,是一个重要的生理指标,它可以正确反映鱼体本身的客观规律,在生产上有一定的意义。我们设想,可以利用这一技术,在产前对亲鱼进行诊断,研究鲮鱼是否当Fspp-b出现的时候催产,以提高催产成功率。如果掌握了青、草、鲢、鳙的血浆蛋白变化和性腺发育规律,就可以避免常因选择亲鱼不当,影响催产效果。这是一个值得进一步深入探讨的问题。

小 结

本研究采用聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳,根据血清蛋白成份分子量的大小和趋电性分带,对性腺未分化和性腺成熟及卵黄积累过程中血清蛋白的变化进行分析。结果看出:性腺未分化和成熟的雄性个体血清蛋白成分无显著差别(或变化);而雌性,

特别当卵细胞发育进入不同时相,血清蛋白呈现有规律的变化。而且在雌性个体发现两条特殊区带。因此鮫鱼在不同的性腺发育期,激素调节的生理效应和血清蛋白的变化是有密切关系的。

参 考 文 献

- [1] 广西壮族自治区水产研究所: 广西鮫鱼的生物学及其养殖, 水生生物集刊, 5(4):439—498(1975)。
- [2] 李广有、陈奋昌: 池养鮫鱼性腺周年变化的研究, 水产学报, 2(3):59—65(1965)。
- [3] 王兴娟、马立人: 聚丙烯酰胺凝胶电泳的初步经验, 生物化学与生物物理进展, 4: 56—59, (1974)。
- [4] 王精豹、王祖熊: 白鮫血浆蛋白组成的变动及其与卵黄形成的关系, 水生生物集刊, 5(1): 122—126(1964)。
- [5] 王祖熊、王精豹: 白鮫性腺及肝脏中脂肪含量与性质的研究, 同上期刊, 115—120。
- [6] 王祖熊、孙美娟等: 池养白鮫生殖周期中卵巢生化组成变化的研究, 同上期刊, 103—113。
- [7] 施琼芳等: 鮫鱼性腺周年变化的组织学研究, 同上期刊, 77—93。
- [8] 郑斯涌等: 白鮫卵巢发育过程中的磷化物含量变化的研究, 水产学报2(1): 21—31 (1965)。
- [9] 湖北水生生物研究所鱼类遗传育种研究室鮫鱼研究小组: 散鳞镜鮫与兴国红鮫、龙州镜鮫的杂种优势以及鳞被、体色的遗传, 水生生物集刊5(4):439—498(1975)。
- [10] maurer, H. R.: Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis(1971)。
- [11] Nanayan, K. A. et al: clin. chim. Acta, 13, 532(1966)。
- [12] Katsumi Aida et al: Bull. Jap. Soci. sci. fish, 39(11): 1091—1106 (1973)。
- [13] Katsumi Aida et al: Ibid, 39(11): 1107—1115(1973)。
- [14] Urist, M. R. et al: J. Gen. Physiol., 44: 743—756(1961)。
- [15] Uthe, J. F. et al: J. Fish. Bd, Canada, 24(6):1269—1273. (1967)。
- [16] Dmlhon, A: Compt. Rend. Soc. Biol., 148: 1218—1220(1954)。
- [17] Stephen, E. M. et al: J. Morphol., 112(1): 61—75 (1963)。
- [18] Lawrence, S. H. et al: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 107: 998(1961)。
- [19] Scanu, A. et al: J. Exp. Med., 108(2): 185(1958)。
- [20] Reven, C. P. : Oogenesis., Pergamon Press. 1961. P.274。
- [21] 孟宪鏞等: 高脂蛋白血症, 天津医学, 5: 263 1975。