

埋植雄烯二酮一次诱导雄性日本鳗鲡性腺发育成熟的研究*

邓岳松 林浩然

(中山大学生命科学院 广州 510275)

提要 埋植雄烯二酮包膜型药条一次后 70 d, 塘养雄鳗成熟率达 73.3%。鳗鲡精液质量随埋植天数的增加逐步提高; 脑垂体促性腺激素 (GtH) 含量在埋植后有明显升高; 血清 GtH 含量在埋植后 15 d 起, 一直稳定在 2 ng/ml 左右, 与对照组 (约 0.9 ng/ml) 相比有显著提高。

关键词 日本鳗鲡, 埋植, 雄烯二酮, 性腺, 发育成熟

 鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 是一种在淡水中生活, 海水中繁殖的鱼类, 其人工繁殖问题尚未解决。有关人工诱导雄鳗性腺发育成熟的报道较多, 常用的方法是多次注射 (5~7 次) 或多次埋植 (4~5 次) 外源激素^[2,4], 虽然这两种方法都可催熟雄鳗, 但存在处理次数

多, 费工费时, 对鱼影响大的缺点。因此有必要寻找一种方法, 只需一次处理就可催熟鳗鲡, 本文报道了埋

* 国家自然科学基金资助项目 39770101 号。

收稿日期: 1999-07-19; 修回日期: 1999-11-04

植雄烯二酮 (4-androstene-3, 17-dione, ADSD) 缓释制剂一次, 诱导雄性日本鳗鲡性腺发育成熟的初步结果。

1 材料与方法

1.1 实验动物及激素处理

塘养日本鳗鲡于 1998 年 12 月购自广州, 共 27 尾。体重平均为 305.5 g, 范围 265~395 g; 体长平均 60.5 cm, 范围 57~68 cm。鱼购回后蓄养于 1 m×0.6 m×0.5 m 的循环水族箱中, 用 4 d 时间逐步适应盐度 28~32 的人工海水 (用广州市海马盐业公司的海水素配制)。鱼在实验期间不投喂, 自然水温 (12~22 ℃) 和光照。

实验鱼被随机分为对照组 (7 尾鱼) 和实验组 (20 尾鱼)。实验组埋植包膜型 ADSD 药条, 对照组埋植不含 ADSD 的药条。药条制作参考 Lin 等^[4]的方法并加以修改; 将 ADSD (Sigma 公司, USA) 与硅橡胶 (Silastic 382, Dow Corning Corporation, USA) 以 1:1 的比例均匀混合, 加入少量硫化剂混匀后, 涂于铝制模板上, 50 ℃ 烘干, 制成 0.75 mm×0.75 mm×30 mm 的药条, 每条含 ADSD 约 30 mg; 将药条按埋植剂量切成适当长度, 再在药条上涂 0.1±0.05 mm 厚的已加硫化剂的硅橡胶, 烘干后即成包膜型药条。给药方法为: 将鳗鲡用碎冰麻醉后, 用眼科手术刀在其腹部划一个 2 mm 的口子, 用镊子将药条或药囊送入鱼腹腔, 伤口涂四环素或红霉素以防感染。埋植剂量为每克体重埋植 ADSD 150×10^{-6} 。

1.2 鳗鲡性腺发育状况及精液质量评价

在埋植 ADSD 后的第 30 天起, 每隔 10 d 用挤压鳗鲡腹部的方法检查亲鱼是否成熟, 若有精液流出则认为亲鱼已成熟。为了解精液质量在埋植后的变化, 用液氮标记部分先成熟的鳗鲡 (即用金属器械在液氮中浸 2~3 min 后, 在鳗鲡身体不同部位烙上印记), 并定时收集精液和评价精液质量: 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, 轻压鳗鲡腹部, 用干净吸管将精液移入冰浴的 1.5 ml 离心管, 要求无尿、粪便、血液的污染; 精液质量用精液量、精子活力和精液浓度评价。精液量: 用体积表示, 误差 ±0.01 ml; 精子活力: 以精子在 450 mmol/L 的 NaCl 溶液中激活比例表示; 精液浓度: 用人工精浆 (140.8 mmol/L NaCl + 18.4 mmol/L KCl + 1.1 mmol/L CaCl₂ + 1.8 mmol/L MgCl₂) 将精液稀释 2

000 倍后, 用血球计数板计数, 再算出精液浓度。

在埋植 ADSD 后 30 d, 解剖 5 尾实验组的鱼取性腺, 计算性腺成熟系数 ($GSI = \text{性腺重} / \text{鱼体重} \times 100\%$)。埋植 ADSD 后 70 d, 将实验组和对照组剩下的鱼 (15 尾) 全部处死, 取性腺, 计算 GSI。

1.3 鳗鲡脑垂体及血清样品的采集和 GtH 含量测定

埋植 ADSD 后 0, 5, 15, 30, 45, 60, 70 d, 随机从 8 尾实验组鳗鲡或 5 尾对照组鳗鲡的尾部血管抽血, 血液 4 ℃ 放置 4 h 后, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 (血清), -25 ℃ 保存。在杀鱼取性腺的同时取脑垂体, -25 ℃ 保存待测 GtH。脑垂体和血清 GtH 的放射免疫测定参照 Lin 等^[4]的方法。脑垂体测定前加入 1 ml/mg 的巴比妥钠缓冲液, 用超声波匀浆器匀浆。

1.4 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, 两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 (用 * 表示), $P < 0.01$ 认为差异极显著 (用 ** 表示)。

2 结果

2.1 亲鱼成熟状况

7 尾埋植不含 ADSD 的空白药条的对照组无 1 尾成熟, 实验组鳗鲡成熟情况见表 1。从表 1 可看出埋植 ADSD 一次后, 15 尾亲鱼在 70 d 中有 11 尾达性成熟, 成熟率为 73.3%, 其中有 2/3 的鳗鲡是在埋植后 60 d 内达性成熟的。

表 1 鳗鲡性成熟尾数

Tab.1 The number of ripe eels

埋植后天数 (d)	成熟尾数	未成熟尾数	成熟率 (%)
30	0	15	0
40	2	13	13.3
50	7	8	46.7
60	10	5	66.7
70	11	4	73.3

鳗鲡在性成熟过程中 GSI 变化较大, 埋植后 30 d 的 GSI 为 $0.87 \pm 0.25\%$ ($n = 5$), 埋植后 70 d 的 GSI 为 $2.1 \pm 1.2\%$ ($n = 15$), 分别比对照组的 GSI ($0.07 \pm 0.03\%$, $n = 7$) 高 12.4 倍和 30 倍, 有极显著差异。因

此在激素处理期间, 鳗鲡 GSI 有随时间推移不断增高的趋势。

2.2 精液质量变化

将第 40 天和第 50 天成熟的鳗鲡用液氮标记, 并评价其精液质量(取平均值), 结果见表 2。结果说明随埋植后时间的推移, 精液质量有较大的变化。刚达性成熟时, 精液质量较差, 精液不仅量少 (<0.15 ml), 密度和活力也低; 达性成熟后 20 d 或 30 d, 精液质量有较大提高。

表 2 精液质量变化

Tab.2 Changes of milt quality of *Anguilla japonica*

埋植后天数 (d)	体积 (ml)	密度 ($\times 10^9$ 个/ml)	活力 (%)
40($n=2$)	0.12 ± 0.07	10.5 ± 0.7	48.5 ± 9.2
50($n=7$)	0.17 ± 0.04	9.5 ± 3.4	62.3 ± 15.8
60($n=7$)	0.32 ± 0.1	15.1 ± 2.75	83.8 ± 19.7
70($n=7$)	0.34 ± 0.11	16.3 ± 2.48	88.4 ± 12.3

2.3 脑垂体及血清 GtH 含量的变化

表 3 说明埋植 ADSD 15 d 后即可使血清 GtH 含量显著上升, 之后, 血清 GtH 含量除在 30 d 时有一个高峰外, 一直稳定在 2.0 ng/ml 左右。实验组从第 15 天起血清 GtH 含量与对照组 ($0.6 \sim 1.2$ ng/ml) 相比有明显升高。

表 3 血清 GtH 含量的变化 (ng/ml)

Tab.3 Changes of serum GtH contents of *Anguilla japonica*

埋植后天数 (d)	血清 GtH 含量	
	实验组	对照组
0	0.75 ± 0.13	0.74 ± 0.18
5	0.70 ± 0.23	0.67 ± 0.16
15	$2.17 \pm 0.47^{**}$	0.87 ± 0.21
30	$3.44 \pm 0.75^{**}$	1.07 ± 0.27
45	$2.4 \pm 0.46^{*}$	1.0 ± 0.24
60	$2.01 \pm 0.2^{**}$	0.82 ± 0.31
70	$2.15 \pm 0.09^{**}$	0.79 ± 0.25

埋植 ADSD 后实验组脑垂体 GtH 含量有明显的升高, 在 30 d 和 70 d 其含量分别为 $2\,242.01 \pm 559.16$ ng/mg 脑垂体和 $2\,355.1 \pm 1\,043.3$ ng/mg 脑垂体, 升高倍数是对照组 (400.89 ± 191.2 ng/mg) 的 5~8 倍, 有极显著差异。

3 讨论

3.1 包膜型药条与非包膜型药条催熟效果

之比较

鱼类性腺发育和成熟是在下丘脑-脑垂体-性腺轴 (HPG 轴) 的调控下完成的, 其中脑垂体分泌的 GtH 是起中心调节作用的激素, 硬骨鱼类的性成熟是 GtH 缓慢而稳定增加的结果。ADSD 可通过正反馈作用增加鳗鲡脑垂体和血清 GtH 的含量, 促进性腺发育。因此用 ADSD 来催熟鳗鲡可避免使用外源 GtH (如鲤鱼或鲑鱼脑垂体、HCG 等) 带来的“异种免疫”和刺激性腺异常发育等问题。但直接注射 ADSD, 将很快被代谢清除, 需反复多次注射, 操作麻烦; 且激素作用方式是脉冲式, 可能干扰 HPG 轴的正常功能, 导致内分泌异常, 进而影响性腺发育。Lin 等^[4]将 ADSD 缓释技术应用于鳗鲡催熟, 埋植所用的是无包膜型硅橡胶药条, 每根含 ADSD 13 mg 左右, 在鱼体内作用时间约为 15 d, 作用时间较短, 催熟下海雄鳗需埋植 4~5 次 (60~75 d), 催熟率为 73%~82.5%。

本实验所用 ADSD 缓释制剂与上述不同的是: (1) 在含药的硅橡胶药条外加了一层空白硅橡胶膜, 有资料表明空白硅橡胶膜可对类固醇激素的释放起更好的调控作用^[3]; (2) 增大了药条载药量, 从 13 mg 增加到 30 mg; (3) 增大了埋植剂量, 从 50×10^{-6} 体重增加到 150×10^{-6} 体重。实验结果表明, 埋植一次后 70 d, 鳗鲡性成熟率达 73.3%, 与非包膜型药条埋植 4~5 次的结果相近, 由于本实验所用的是普通的塘养鳗, 催熟效果是较好的。结果还表明, 在埋植激素后 15 d 起, 血清 GtH 含量一直稳定在 2 ng/ml 左右, 明显高于对照组 (0.9 ng/ml 左右); 埋植 ADSD 后还可使脑垂体 GtH 含量增加, 达对照组的 6~10 倍, 证明一次埋植就可有效诱导内源性 GtH 增加, 从而促进性腺发育。包膜型药条不仅对雄鳗有效, 对雌鳗也有效果, 埋植一次后可使卵巢发育到 IV 时相早期 (待发表)。至于催熟效果与药条载药量、包膜厚度、埋植剂量等关系及激素效果能持续多久还有待进一步研究。

3.2 鳗鲡精液质量

鳗鲡精液质量的好坏直接关系到受精率的高低。在本实验中发现: 刚达性成熟的鳗鲡不仅产生的精液量少, 精子密度和活力也低; 鳗鲡达性成熟后 20~30 d, 可获得较高质量的精液, 不仅精液量增加, 密度、活力也增高。鳗鲡精液量的增加与 GSI 的增加有关; GSI 增大即性腺在鱼体所占的重量和体积的增加, 所产生的精子数量也增加, 精液量和精子密度自

然也增加了。Ohta 等证明鳗鲡精巢中的精子在高浓度的 HCO_3^- 和 pH 环境中可获得较高的活力^[3], 因此, 鳗鲡精子活力的增高与精巢或输精管的 pH 或 HCO_3^- 浓度的增加有关。鳗鲡精液质量呈先低后高的趋势, 也许符合其繁殖生理的要求, 因为雄鳗性成熟较雌鳗早, 当雌鳗达性成熟时, 雄鳗正好可提供较高质量的精液。🐟

参考文献

- 1 陆 彬. 药物新剂型与新技术. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 1~
- 2 Ohta, H. *et al.*. *Fisheries Science*, 1996, **62**(1): 44~49
- 3 Ohta, H. *et al.*. *J. Exp. Zool.*, 1997, 277: 171~180
- 4 Lin Hao-Ran *et al.*. *Bull Fr Pêche Piscic*, 1998, 349: 163~176

INDUCED GONADAL MATURATION BY SINGLE IMPLANTATION OF ANDROSTENEDIONE IN MALE *Anguilla japonica*

DENG Yue-song LIN Hao-ran

(School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Received: Jul. 19, 1999

Key Words: *Anguilla japonica*, Implantation, Androstenedione, Gonad, Maturation

Abstract

The gonad of 73.3% cultivated male eel could be induced maturation by single implantation of androstenedione. The milt quality and the GtH contents of pituitary gradually increased after hormone implantation. The serum GtH profiles was stable at 2.0 ng/ml 15 days later.

(本文编辑: 刘珊珊)