

LHRH-A 和 5-HT 拮抗剂的协同作用对草鱼鱼种生长激素分泌活动和生长的影响

孙颖^{1,2}, 陈练茜¹, 林浩然¹

(1. 中山大学生命科学学院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. 深圳职业技术学院 应用化学与生物技术学院, 广东 深圳 510755)

摘要:促性腺激素释放激素(LHRH)能够促进鱼类生长激素(GH)的释放,而5-羟色胺(5-HT)抑制鱼类GH的释放。将促性腺激素释放激素类似物(D-Ala⁶-Pro⁹-NH₂-LHRH, LHRH-A, 5 μg/g 饵料)和5-HT的特异性拮抗剂盐酸米安色林(Mianserin hydrochloride MIS, 0.5 mg/g 饵料)拌在饵料中投喂草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)鱼种6周,可促使血清GH水平显著提高,并使食物转化率升高,生长速率加快,肥满度增加;且两者促生长的协同作用比单独使用LHRH-A或MIS好。对草鱼鱼种体质和主要生化组成的分析表明,LHRH-A和MIS的促生长作用既没有引起鱼体可食部分的蛋白质含量减少,也不会使脂肪、水分含量和内脏质量增加,因而其促进的是草鱼种苗均衡、正常的生长。由此说明在生产应用中,使用高活性的神经内分泌因子,通过拌饵方式投喂对于促进养殖鱼类苗种的生长、缩短养殖周期,是有效而且安全的。[中国水产科学, 2007, 14(3): 473-477]

关键词:草鱼; 生长; 生长激素; LHRH-A; 5-HT; MIS

中图分类号: Q959.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2007)03-0473-05

硬骨鱼类生长激素(GH)的分泌活动受下丘脑分泌的多种释放因子和抑制因子的双重调控,如生长激素释放因子(GRF)^[1]、促甲状腺素释放激素(TRH)^[2-3]、促性腺激素释放激素(GnRH)^[3-4]等刺激GH的合成与分泌,而生长激素抑制素(SRIF)^[3,5-6]、5-羟色胺(5-HT)^[7-8]等抑制GH的释放。通过增加释放因子的作用或削弱抑制因子的作用都可以达到加强鱼体内源性GH的合成和释放,升高血液的GH水平,促进鱼类生长的目的。

除了直接施用外源GH制品促进鱼类生长外,国内外学者均致力于筛选高活性、用量少、来源方便、成本低和无副作用的药物及组合,通过这些外源药物刺激鱼体内源性GH的合成和分泌,以促进鱼类生长。

促性腺激素释放激素类似物(D-Ala⁶-Pro⁹-NH₂-LHRH, LHRH-A)是哺乳类促性腺激素释放激素(GnRH, LHRH)的高活性类似物。近年来对金鱼和鲤鱼的研究证明, GnRH及其高活性类似物能刺激在体和离体脑垂体释放GH^[3,9-11]。对草鱼的研究也表明,无论是注射还是拌饵投喂, LHRH-A都

能显著提高草鱼血清GH水平,并促进其生长^[4]。

盐酸米安色林(Mianserin hydrochloride, MIS)是5-羟色胺(Serotonin, 5-HT)的一种特异性拮抗剂,能刺激GH的释放^[12-14],但它在提高养殖鱼类生长率方面的作用国内外还未见报道。本实验研究投喂LHRH-A和MIS对草鱼鱼种GH释放的促进作用,并探讨LHRH-A与MIS的协同作用对草鱼鱼种GH分泌和生长产生的增强效应,以寻求效果较佳的促生长合剂,为鱼种培育过程中提高生长速率,缩短苗种培育周期,提高养殖产量提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼及其暂养

草鱼鱼种(体质量20~40 g,体长10~13 cm)购自中山大学生命科学学院水生经济动物研究所实验渔场。选取经过驯养的健康草鱼鱼种,随机放养于0.8 m×0.6 m×0.45 m的室内水族箱内,每箱15尾,实验时间为5~6月,实验期间采用自然光照和水温(19.8~25.2℃),24小时通氧,水体循环过

收稿日期: 2006-06-05; 修订日期: 2006-12-28.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39570099), 教育部科学技术研究委员项目(02150), 高校博士点专项科研基金资助项目(20040558012).

作者简介: 孙颖(1972-), 女, 讲师, 研究方向为鱼类生理学. E-mail: bioying@gmail.com

通讯作者: 林浩然. E-mail: ls32@zsu.edu.cn

滤。实验过程中,每天投饵两次(8:00,18:00),每天投喂量为草鱼鱼种体质量的3%左右。

1.2 实验饲料和试剂

干酪素40%;糊精30%;花生油2%;复合维生素1%;无机盐(包括微量元素)9.3%。投喂实验所用的饵料是将LHRH-A(浙江宁波水产激素厂)和MIS(美国RBI公司)以一定剂量拌入基本饵料中,加工成颗粒饵料。

1.3 生物学指标的计算

(1)测定指标按下列公式计算:

$$\text{体质量增长率(SGR)} = (W_t - W_0) / W_0 \times 100\%$$

$$\text{体长增长率(LGR)} = (L_t - L_0) / L_0 \times 100\%$$

其中, W_0 和 L_0 分别表示实验开始时草鱼鱼种的体质量和体长;

W_t 和 L_t 分别表示 t 时间点草鱼鱼种的体质量和体长。

(2)食物转化率(FCR) = $(\Delta W / F) \times 100\%$,

F 表示在一段时间内草鱼鱼种的食物投喂量(g), ΔW 表示在这段时间内草鱼鱼种的体质量增加(g)。

(3)肥满度(Condition factor, K) = $(W / L^3) \times 100\%$ ^[15]

其中, W 为体质量(g), L 为体长(cm)。

(4)肝脏体质量比:肝脏质量占鱼体质量的百分比。

(5)内脏体质量比:内脏质量占鱼体质量的百分比。

1.4 样品制备和测定

1.4.1 血清样品的制备与GH的测定 将鱼用MS-222(Tricaine methanesulfonate,加拿大Syndel公司,体积比1:10 000)麻醉后,从尾静脉取血样约1 mL。血液在4℃静置4~6 h后离心(15 000 r/min,5 min),分离出血清,保存于-20℃,以备测GH含量。血清GH的含量参照Cook等^[16]的双抗放射免疫法测定。

1.4.2 水份含量、粗蛋白含量及粗脂肪含量测定

将全鱼、肝脏和肌肉样品置烘箱中(105℃)烘大约12 h至恒重为止。

$$\text{水份含量(\%)} = [(W - G) / W] \times 100$$

W 为湿样重(g), G 为干样重(g)

粗蛋白含量的测定采用凯氏定氮法(Tecator 1030 凯氏自动分析仪,瑞典),粗脂肪含量测定采用索氏抽提法(Tecator 1043 索氏抽提系统,瑞典)。

1.5 实验设计

将60尾健康草鱼鱼种分养于4个水族箱,每组放养15尾。实验前对每尾鱼进行剪鳍标记。实验周期为6周,每周测一次体质量和体长。实验结束时,取所有鱼的血液、肝脏、肌肉样品。实验期间水温为19.8~25.2℃。实验分组及投喂剂量:(1)MIS组,0.5 mg/g基础饲料;(2)LHRH-A组,5 μg/g基础饲料;(3)LHRH-A(5 μg/g基础饲料)+MIS(0.5 mg/g基础饲料)组;(4)对照组(基础饲料)。

1.6 数据处理

数据处理采用Sigmaplot 2000软件进行。数据以平均值±标准差($\bar{X} \pm SD$)表示,不同处理组数据间的差异性采用Student's- t 检验法进行分析。 $P < 0.05$ 认为存在显著性差异, $P < 0.01$ 认为存在极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 LHRH-A、MIS和LHRH-A+MIS对草鱼鱼种血清GH水平的影响

投喂6周后,LHRH-A+MIS组、LHRH-A组和MIS组草鱼鱼种的血清GH水平均极显著高于对照组($P < 0.01$),见图1。而且,LHRH-A+MIS组草鱼鱼种的血清GH水平显著高于LHRH-A组和MIS组($P < 0.05$),但LHRH-A组和MIS组间无显著性差异($P > 0.05$)。

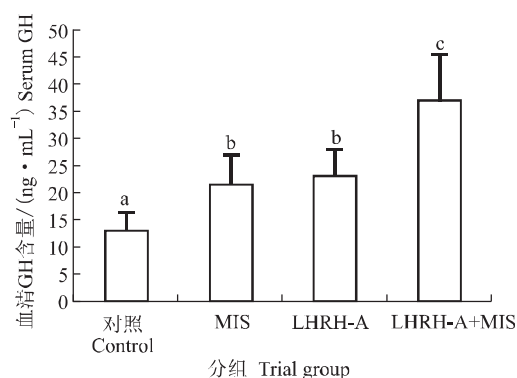


图1 投喂6周后LHRH-A、MIS和LHRH-A+MIS对草鱼鱼种血清GH水平的影响

GH浓度水平均用平均值±标准差表示($n=13\sim15$),柱形图上方的字母不同表示组间显著性差异($P < 0.05$)。

Fig. 1 Effect of LHRH-A, MIS and LHRH-A+MIS on the serum GH of juvenile grass carp following dietary incorporation over 6 weeks

Values are represented as $\bar{X} \pm SD$ ($n=13\sim15$). Columns with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

2.2 LHRH-A、MIS 和 LHRH-A+MIS 对草鱼鱼种的促生长作用

投喂 6 周后,MIS、LHRH-A 和 LHRH-A + MIS 组均极显著($P<0.01$)促进了草鱼鱼种的体质量增加(图 2—A) 和体长增长(图 2—B)。LHRH-A+MIS 组的体质量增长率分别极显著($P<0.01$)

和显著高于 MIS 组($P<0.01$)和 LHRH-A 组($P<0.05$),但 MIS 组和 LHRH-A 组间无显著差异($P>0.05$);同时,LHRH-A+MIS 组的体长增长率极显著高于 LHRH 组($P<0.001$),但与 MIS 组无显著差异($P>0.05$)。

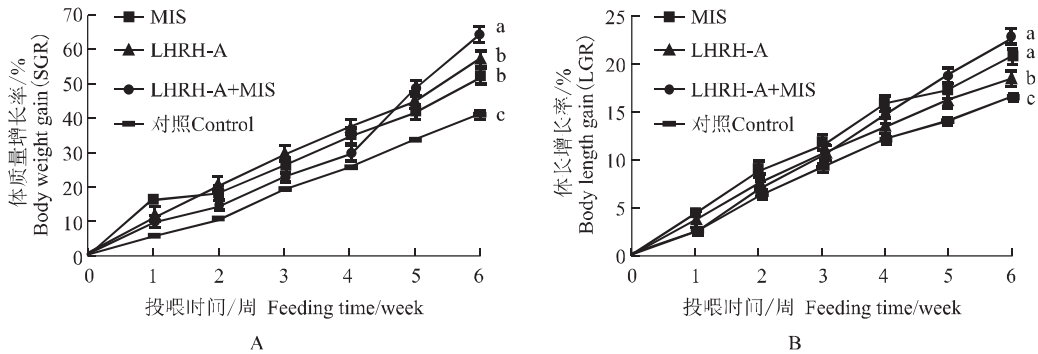


图 2 投喂 LHRH-A、MIS 和 LHRH-A+MIS 对草鱼鱼种体质量生长率(A)和体长增长率(B)的影响
不同字母表示组间显著性差异($P<0.05$)($n=13\sim15$)。

Fig. 2 Effects of LHRH-A, MIS and LHRH-A+MIS on body weight growth rate (SGR) and length growth rate (LGR) of juvenile grass carp
Columns with different superscript are significantly different($P<0.05$)($n=13\sim15$).

2.3 LHRH-A、MIS 和 LHRH-A+MIS 对草鱼鱼种肥满度、内脏比和食物转化率的影响

投喂 6 周后,MIS 组和 LHRH-A 组草鱼鱼种的食物转化率高于对照组($P<0.05$),而 LHRH-A +MIS 组草鱼鱼种的食物转化率又高于 LHRH-A

组和 MIS 组。LHRH-A+MIS 组草鱼鱼种的肥满度显著高于 LHRH-A 组,MIS 组和对照组($P<0.05$)。但是,各个实验组草鱼鱼种的内脏体质量比、肝脏体质量比和水份含量与对照组均无显著差异($P>0.05$),见表 1。

表 1 LHRH-A、MIS 和 LHRH-A+MIS 对草鱼鱼种的食物转化率和肥满度以及水份含量、内脏比、肝比的影响
Tab. 1 Food conversion rate, condition factor(K)and percentage of body moisture, visceral weight to body weight as well as liver weight to body weight of juvenile grass carp following dietary incorporation of LHRH-A, MIS and LHRH-A+MIS

$n=13\sim15; \bar{X} \pm SD; \%$					
实验分组 Group	食物转化率 FCR	肥满度 K	鱼体水份含量 Body moisture	内脏体质量比 Visceral weight/body weight	肝脏体质量比 Liver weight/body weight
对照组 Control	43.0 ^a	1.46±0.05 ^a	75.62±3.08 ^a	8.55±0.71 ^a	2.98±0.45 ^a
MIS	45.80 ^b	1.50±0.04 ^a	77.24±2.91 ^a	9.64±1.27 ^a	3.22±0.48 ^a
LHRH-A	45.80 ^b	1.50±0.04 ^a	76.42±2.45 ^a	8.77±1.01 ^a	3.02±0.98 ^a
LHRH-A+MIS	50.1 ^{bc}	1.55±0.04 ^b	77.39±1.33 ^a	8.13±0.85 ^a	2.70±0.41 ^a

注:同一列数值的不同上标表示组间具有显著性差异($P<0.05$).
Note: Means with different superscripts in the same line are significantly different($P<0.05$).

2.4 LHRH-A、MIS 和 LHRH-A+MIS 对草鱼鱼种的肌肉和肝脏生化组成的影响

投喂 6 周后,各组的肌肉和肝脏主要生化组成

(蛋白质、脂肪和水份含量)都没有显著差异($P>0.05$),见表 2。

表2 LHRH-A、MIS和LHRH-A+MIS对草鱼鱼种的肌肉和肝脏生化组成的影响

Tab. 2 Protein, lipid and moisture contents in muscle and liver of juvenile grass carp following dietary incorporation of LHRH-A, MIS and LHRH-A+MIS $n=13\sim15; \bar{X}\pm SD; \%$

实验分组 Group	肌肉 Muscle			肝脏 Liver		
	蛋白 Protein	* 脂肪 Lipid	水分 Moisture	蛋白 Protein	* 脂肪 Lipid	水分 Moisture
Control	85.69 $\pm$ 1.28	5.37 $\pm$ 2.44	77.97 $\pm$ 1.16	28.10 $\pm$ 10.22	59.80 $\pm$ 19.51	62.13 $\pm$ 5.10
MIS	86.84 $\pm$ 1.80	5.05 $\pm$ 1.13	78.44 $\pm$ 0.99	26.46 $\pm$ 2.30	63.89 $\pm$ 2.41	59.98 $\pm$ 1.53
LHRH-A	86.48 $\pm$ 2.54	4.92 $\pm$ 0.54	84.06 $\pm$ 17.58	26.38 $\pm$ 8.42	58.21 $\pm$ 6.82	60.40 $\pm$ 7.20
LHRH-A+MIS	86.46 $\pm$ 1.21	5.02 $\pm$ 1.74	79.26 $\pm$ 3.06	30.04 $\pm$ 2.85	56.60 $\pm$ 9.07	60.79 $\pm$ 1.38

注:同一列数值的不同上标表示组间具有显著性差异($P<0.05$);* 占样品干质量的比值。

Note: Means with different superscripts are in the same line significantly different ($P<0.05$), * represents percentage of dried sample.

3 讨论

与哺乳类相似,鱼类的生长受到脑(各种神经内分泌因子)-脑垂体(由生长激素细胞分泌的生长激素, GH)-肝脏(肝细胞产生的类胰岛素生长因子, IGF)轴的调控。在水产养殖生产实践中一个重要的应用途径就是在饲料中加入一些能刺激鱼类生长激素分泌的高活性神经内分泌因子,如 GRF 的类似物、GnRH 的类似物、DA 的激动剂等,以加强鱼类自身内源性 GH 的合成与分泌,从而促进鱼类的生长^[17]。

本研究证实, LHRH-A 和 5-HT 的特异性拮抗剂 MIS 通过投喂的方式,可以直接由鱼体消化道吸收,进入血液循环并保持生物活性,从而刺激鱼体内源性 GH 分泌,提高食物转化率,增加肥满度,促进鱼体生长。此结论与先前已有的研究结果,如通过灌喂或拌料投喂神经内分泌因子都能对草鱼和金鱼的 GH 分泌和生长速率起显著促进作用的结论^[4]一致,并再次证实了一些多肽和蛋白质能被鱼类消化道部分吸收而进入血液循环并保持其生物活性的结论。

本研究结果还表明, LHRH-A 与 MIS 的协同作用比单独作用的效果好。可见,将能刺激 GH 分泌的多肽类化合物(如 LHRH-A)与非肽类化合物(如 MIS)一起添加在饵料中投喂,是提高口服活性的一种有效方法。因为多肽类化合物在鱼类消化道内抗水解能力差,只能被部分吸收,而非肽类化合物如苯并氮杂卓酮体系列化合物(如 MIS)和螺哌啶系列化合物,抗水解能力强,表现出较好的体外活性和口服活性^[18]。

目前已经很清楚,神经内分泌因子和 GH 参与了鱼类食欲和摄食行为的调节。神经内分泌因子或

其拮抗剂可以刺激鱼类的摄食行为和内源性 GH 的升高,进而提高食物转化率,最终达到促进鱼类快速生长的目的^[12],这在鱼类养殖生产中将有广泛的应用前景。

值得注意的是,投喂 6 周后,各个实验组草鱼鱼种的内脏体质量比、肝体质量比和水份含量与对照组均无显著差异;各实验组肌肉和肝脏生化指标(蛋白质、脂肪和水份含量)与对照组也都没有显著差异。这说明,对草鱼鱼种投喂 LHRH-A 和 MIS 可促进其正常的、均衡的生长,既没有引起内脏的增大,可食部分的减少,也没有使肉质下降。因而证明投喂这些神经内分泌因子或其拮抗剂,对草鱼鱼种产生的促生长作用不会改变鱼体的肉质和食用性。

总之, LHRH-A 和 MIS 将有望成为一种安全、高效的促生长剂。今后还需通过大量的实验,筛选出高活性、用量少、来源方便、成本低和无副作用的药物及组合,以提高鱼种生长速率,缩短鱼种培育周期,提高养殖产量。

参考文献:

- [1] Vaughan J M, Rivier J, Spiess J, et al. Isolation and characterization of hypothalamic growth hormone-releasing factor from common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Neuroendocrinology, 1992, 56: 539-549.
- [2] Trudeau V L, Somoza G M, Nahorniak C S, et al. Interactions of estradiol with gonadotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone in the control of growth hormone secretion in the goldfish [J]. Neuroendocrinology, 1992, 56: 483-490.
- [3] Lin X W, Lin H R, Peter R E. Growth hormone and gonadotropin secretion in the common carp (*Cyprinus carpio* L.): In vitro interactions of gonadotropin-releasing hormone, somatostatin, and the dopamine agonist apomorphine [J]. Gen Comp Endocrinol, 1993, 89: 62-71.
- [4] Lin H R, Zhang Q, Peter R E. Effects of recombinant tuna

- growth hormone and analogs of gonadotropin-releasing hormone on growth of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Aquaculture*, 1995, 129—342.
- [5] Cook A F, Peter R E. The effects of somatostatin on serum growth hormone levels in the goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1984, 54:109—113.
- [6] Marchant T A, Fraser R A, Andrews P C, et al. The influence of mammalian and teleost somatostatins on the secretion of growth hormone from goldfish (*Carassius auratus*) pituitary fragments in vitro [J]. *Regul Peptides*, 1987, 17:41—52.
- [7] Peter R E, Yu K L, Marchant T A, et al. Direct neural regulation of the teleost adenohypophysis [J]. *J Exp Zool*, 1990, 4 (Suppl):84—89.
- [8] Somoza G M, Peter R E. Effects of serotonin on gonadotropin and growth hormone release from in vitro perfused goldfish fragments [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1991, 82:103—110.
- [9] Marchant T A, Chang J P, Nahorniak C S, et al. Evidence that gonadotropin-releasing hormone also functions as a growth hormone-releasing factor in the goldfish [J]. *Endocrinology*, 1989, 124:2 509—2 518.
- [10] 林信伟, 林浩然. 促性腺激素释放激素类似物促进鱼类生长激素分泌和生长 [J]. *水产学报*, 1993, 17 (4):282—288.
- [11] 林信伟, 林浩然. 鲑鱼促性腺激素释放激素 (sGnRH) 调节鲤鱼脑垂体生长激素分泌的离体研究 [J]. *动物学报*, 1994, 40 (1):30—38.
- [12] Peng C, Peter R E. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion and growth in fish [J]. *Zool Studies*, 1997, 36 (2):79—89.
- [13] Peter R E, Marchant T A. The endocrinology of growth in carp and related species [J]. *Aquaculture*, 1995, 129:299—321.
- [14] Peter R E, Chang J P. Growth hormone secretion in the fish [C]//Sellchiro Kawashima, Sakae Kikuyama. *Advances in comparative endocrinology, proceeding of XIII international congress of comparative endocrinology* [C]. Japan: Yokohama, November, 1997:915—919.
- [15] Weatherly A H, Gill H S. *The Biology of Fish Growth* [M]. London: Academic Press, 1987:1—433.
- [16] Cook A F, Wilson S W, Peter R E. Development and validation of a carp growth hormone radioimmunoassay [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1983, 50:335—347.
- [17] 林浩然. 鱼类生长和生长激素分泌活动的调节 [J]. *动物学报*, 1996, 42:69—79.
- [18] 肖东, 林浩然. 鱼类摄食和生长的神经内分泌调控途径研究进展 [J]. *中国水产科学*, 2000, 7(3):102—106.

Effects of LHRH-A and 5-HT antagonist on growth hormone secretion and body growth acceleration in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

SUN Ying^{1,2}, CHEN Lian-xi¹, LIN Hao-ran¹

(1. Institute of Economic Aquatic Animal, School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China; 2. School of Applied Chemical and Biological Technology, Shenzhen Polytechnic College, Shenzhen 510755, China)

Abstract: LHRH-A (D-Ala⁶-Pro⁹-NET-LHRH, an analog of GnRH) and Mianserin hydrochloride (MIS, 5-HT antagonist) was orally administrated as a feed stuff additive to enhance the growth of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). The results demonstrated that feeding LHRH-A (5 µg/g diet), in combination with MIS (0.5 mg/g diet) twice daily for 6 weeks, resulted in higher levels of serum GH, food conversion ratio, growth rate and condition factor than those feeding LHRH-A or MIS alone. Meanwhile, growth enhancement of juvenile grass carp by feeding LHRH-A and MIS were normal, which did not have any effect on visceral weight and body composition of protein, lipid and moisture. The study confirmed that by dietary delivery, some neuroendocrine factors, such as LHRH-A and MIS, which stimulate endogenous GH secretion, could be absorbed and transported into the circulation immunoactively and bioactively, and subsequently resulted in an increase in serum GH level, food conversion ratio, growth rate and condition factor of juvenile grass carp. It has been demonstrated that administration of some neuroendocrine factors in diet on large scale to accelerate the growth rate of cultured fish has promising potential. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(3):473—477]

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; growth; growth hormone; LHRH-A; 5-HT; MIS

Corresponding author: LIN Hao-ran. E-mail: ls32@zsu.edu.cn