

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.14467

尼罗罗非鱼卵巢发育过程中性类固醇激素与卵黄蛋白原含量变化及 *Vtg* mRNA 表达特征

罗明坤, 赵金良, Thammaratsuntorn Jeerawat, 李传阳, 魏继海, 赵永华

上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306

摘要: 通过组织切片、酶联免疫吸附及荧光定量 PCR 等方法, 研究了尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)卵巢发育过程中性类固醇激素(雌二醇 E_2 、孕酮 P)、卵黄蛋白原(Vtg)含量及 *Vtg* mRNA 相对表达水平变化规律。结果表明, 尼罗罗非鱼性腺指数(GSI)与卵巢成熟发育间呈同步性变化, V 期达到峰值。血清中 E_2 含量自卵巢 II 期开始显著升高, IV 期达到峰值, V 期后显著下降; 血清 P 含量自卵巢 II 期开始不断升高, V 期达到峰值, VI 期显著下降; E_2 、P 分别在卵巢成熟发育前期与后期发挥作用。肝中 Vtg 含量先升、后降, IV 期达峰值; 血清、卵巢中 Vtg 含量均自 II 期开始增加, V 期达峰值, VI 期显著降低; 不同组织中 Vtg 含量变化与卵巢成熟发育间存在密切关联。肝中 *Vtg* mRNA 表达水平在 III 期达到峰值, IV 期后持续下调; 卵巢中 *Vtg* mRNA 表达水平相对较低, V 期达到峰值; 初步推测肝、卵巢同是尼罗罗非鱼 Vtg 合成部位, 肝是 Vtg 合成的主要器官, 在卵黄积累阶段最为活跃, 而卵巢 Vtg 合成水平相对较低。

关键词: 尼罗罗非鱼; 卵巢发育; 性类固醇激素; 卵黄蛋白原; *Vtg* mRNA

中图分类号: S917.4

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)06-1123-10

鱼类性腺发育和配子发生是神经内分泌系统通过下丘脑—垂体—性腺轴(BPG)共同调控实现的, 下丘脑分泌促性腺激素释放激素(GnRH)通过神经元到达垂体, 垂体中促性腺激素(GtH)分泌细胞内 cAMP 信号通路被激活, 促进促卵泡激素(FSH)和促黄体素(LH)的转录、合成和分泌, FSH 和 LH 经血液循环进入性腺, 通过激活性类固醇激素, 包括雌二醇(E_2)、孕酮(P)等的生成, 进而调节性腺发育并促进卵母细胞最后成熟^[1-2]。因此, 性类固醇激素分泌水平可为评价鱼类 BPG 轴生理功能和性腺发育状态提供重要信息^[3]。卵黄蛋白原(Vitellogenin, Vtg)是卵黄蛋白前体, 而卵黄蛋白是卵黄的主要成分, 可为鱼类胚胎发育提供氨基酸、脂肪、维生素等营养和功能性物质^[4]。

鱼类 Vtg 一般是在雌激素(主要为 17β - E_2)作用下于肝细胞内合成, 经血液循环到达卵巢, 再通过微胞饮作用被卵母细胞吸收利用, 其积累程度是卵巢(卵母细胞)成熟发育的重要标志^[5]。

尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)具有生长快、食性广、适应力强等优点, 是中国主要淡水养殖鱼类之一^[6]。其繁殖力强, 主要表现为性成熟早。自然水温下, 尼罗罗非鱼原始性腺于 10 dph (days post hatching)开始形成, 28 dph 可清晰辨认卵原细胞, 呈现明显的性腺分化特征^[7]。性腺发育过程中, 卵巢生长期(II 期、III 期、IV 期)至少由两种不同时期相的卵母细胞组成, 属非同步发育型^[8]。孵出后 4~5 个月开始性成熟, 产卵周期短, 通常每 25~35 d 可繁殖 1 次, 在中国南方地区每年

收稿日期: 2014-11-10; 修订日期: 2015-01-16。

基金项目: 国家现代农业产业技术体系专项资金(CARS-49-4B); 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心项目(ZF1206)。

作者简介: 罗明坤(1989-), 男, 在读硕士生, 从事水产动物遗传育种与繁殖研究。E-mail: mingkunluo@163.com

通信作者: 赵金良(1969-), 男, 教授, 从事水产动物遗传育种与繁殖研究。E-mail: jlzhao@shou.edu.cn

可繁殖 4~6 次;不同个体产卵时间也不一致,繁殖季节时,卵巢成熟系数明显形成数次高峰^[9]。与四大家鱼等鲤科鱼类性腺同步发育、一次性产卵相比,尼罗罗非鱼属典型的非同步发育、多次产卵型鱼类。

关于尼罗罗非鱼卵巢发育中性类固醇激素、卵黄蛋白原相关的分泌调节机制,国内外学者已做了一定的探究。例如,在尼罗罗非鱼性腺发育不同时期转录组学研究中发现, P 不仅对卵巢分化具有重要作用,且对卵巢维持也具有重要意义^[10]。对雌性尼罗罗非鱼转入过表达 *dmrt1* 基因(抑制编码芳香化酶的 *cyp19a1a* 基因转录活性)后,发现血清中 E_2 含量明显降低,卵巢发育延迟,滤泡细胞也发生不同程度退化,约 5% 个体发育为完全雄性^[11]。促性腺激素受体 FSH-R 在尼罗罗非鱼卵母细胞卵黄生成早期高表达,而 LH-R 主要在卵母细胞成熟期和排卵期高表达^[12]。Pap 等^[13]通过蛋白纯化方法从尼罗罗非鱼卵巢中分离出 Vtg、卵黄脂磷蛋白(lipovitellin)、卵黄高磷蛋白(phosvitin)等多种组分。对雌性尼罗罗非鱼腹腔注射 17α -甲基睾丸酮(MT)后,血清中 Vtg 水平极显著下降,肝中 Vtg mRNA 表达水平较注射前降低至 1/5, 17α -MT 对卵母细胞发育成熟起到明显抑制作用^[14]。

由于尼罗罗非鱼性腺发育的不同步性,其卵巢自然成熟发育过程中,性类固醇激素变化规律、卵黄蛋白原合成及卵黄蛋白积累过程尚不清楚。为此,本研究通过观察自然繁殖期尼罗罗非鱼卵巢组织学特征,分析了不同成熟发育时期雌鱼性类固醇激素(E_2 、P)、卵黄蛋白原含量及 Vtg mRNA 表达水平变化与卵巢成熟发育之间的内在关联,以期进一步了解非同步发育型鱼类卵巢成熟发育规律及生理机制,丰富其繁殖生物学基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用尼罗罗非鱼取自上海海洋大学罗非鱼种质资源试验站,均为 1 龄亲鱼。2014 年 4 月

28 日,越冬亲鱼出棚、雌雄鱼按一定性比配比后放入水泥产卵池(7.5 m×4 m×1.5 m)中繁殖。5 月 1 日~6 月 12 日,每次间隔 5 天,共进行 9 次连续采样,随机抽取发育正常的雌鱼 8 尾。雌鱼体长 17.2~21.5 cm,体重 303.1~365.5 g,实验期间自然水温 21~27℃。

1.2 方法

1.2.1 样品采集 每次取样时,用 2 mL 注射器从尾柄处取血 1~2 mL,立即放入 4℃ 冰箱中静置 3~4 h。血液完全凝集后,3500 r/min 离心 20 min,吸出上层血清,置于 4℃ 冰箱中待测。实验鱼进行常规生物学测量[体重(BW)、体长(BL)]后,活体解剖取出肝、卵巢,卵巢称重,计算性腺指数(GSI)=卵巢重(GW)/体重(BW)×100%。一侧卵巢用 Bouin 氏液固定,肝及另一侧卵巢置于-80℃ 冻存。

1.2.2 卵巢组织学观察 固定的卵巢经常规石蜡切片,切片厚度 5~6 μm, H.E. 染色,中性树胶封片,在显微镜(Nikon DS-Ri1)下观察拍照。用目微尺测量卵母细胞直径及核径,统计视野为 20 个。卵巢分期参照刘筠等^[8]提出的分期标准,以超过 50% 或居最高比例的卵母细胞时相来决定卵巢发育时期。

1.2.3 E_2 、P 及 Vtg 含量测定 分别称取 0.5 g 冻存的肝、卵巢组织,加 10 倍体积预冷的生理盐水,在内切式组织匀浆机(XHF-D)上以 1000 r/min 匀浆(冰水浴)。匀浆液于 4℃, 10000 r/min 离心 10 min,取上清液于离心管,置于 4℃ 冰箱中待测。

血清中 E_2 、P 含量和血清、肝、卵巢中 Vtg 含量测定分别使用上海酶联生物科技有限公司提供的鲤鱼 ELISA 试剂盒,具体操作按试剂盒说明进行。采用酶联免疫吸附方法^[15],在 BioTek Synergy 酶标仪 450 nm 波长下测定各自吸光度(OD 值),通过标准曲线计算各样品中 E_2 、P 含量以及 Vtg 含量。

1.2.4 Vtg mRNA 相对表达

(1) 总 RNA 提取 使用 Invitrogen 公司 Trizol 试剂盒分别提取肝、卵巢组织中总 RNA,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,用 NANODROP 2000C 仪测定总 RNA 纯度及浓度,-80℃ 低温保存。

(2) cDNA 的合成 将总 RNA 稀释至 500 ng/ μ L, 使用宝生物工程(大连)有限公司 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 进行 RT-PCR 扩增, 具体操作按试剂盒说明进行, 反转录产物放入 4℃ 冰箱保存。

(3) 引物设计 参照 GenBank 中尼罗罗非鱼卵黄蛋白原 *Vtg* (FJ231887)、 β -actin (EU887951) cDNA 序列, 用 Primer premier 5.0 软件设计 *Vtg* 基因和内参基因 β -actin 的特异性扩增引物(表 1), 由生工生物工程(上海)有限公司合成。

表 1 尼罗罗非鱼荧光定量 PCR 引物
Tab. 1 Primers used for qRT-PCR of *Oreochromis niloticus*

引物名称 primer	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	退火温度/℃ annealing temperature
VTG F	CCTTTCCATCCAGCCACCAA	60
VTG R	CAGCCAGTCTCCCAACAA	
β -Actin F	CAGCAGATGTGGATCAGCAAGC	
β -Actin R	TGAAGTTGTTGGGCGTTTGG	

(4) 实时荧光定量 PCR 扩增 实时荧光定量 PCR 扩增参照 SYBR Premix *Ex Taq* 说明书进行, 扩增程序为: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s、60℃ 30 s, 39 个循环; 95℃ 10 s, 65~95℃ 熔解。所有样品重复 3 次, 根据结果调整扩增反应体系, 使目的基因和内参基因扩增效率接近 100%。用 Livak 等^[16]建立的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *Vtg* mRNA 相对表达水平。

1.2.5 数据分析 所有数据均用 Excel 2007 软件进行分析, 结果用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm SD$)形式表示。使用 SPSS 17.0 统计软件进行差异显著性分析, 利用单因素方差分析法(ANOVA)对数据进行方差分析, 差异显著时用 Duncan's 法多重比较, 显著水平为 $P<0.05$, 极显著水平为 $P<0.01$ 。采用 sigma Plot10.0 制作图表。

2 结果与分析

2.1 卵母细胞和卵巢发育特征

根据不同采样时期卵母细胞形态特征变化, 将卵巢发育分为 5 个时相(图 1), 各期主要特征如下: (1) II 时相 卵母细胞成簇地分布, 卵径 16~75 μ m; 卵巢细长, 透过卵巢膜可见白点状细小卵粒。(2) III 时相 卵径 110~240 μ m, 核仁沿核膜分布, 外侧有滤泡细胞; 卵巢增大变粗, 呈囊状。(3) IV 时相 卵径 410~700 μ m, 核仁数增多, 细胞质开始出现空泡, 卵黄颗粒数量增多; 卵巢体积增大, 呈圆筒状, 浅黄色。(4) V 时相 卵径 1100~1600 μ m, 卵黄充满, 核移向动物极,

核仁开始溶解; 卵巢体积增至最大, 呈深黄色。(5) VI 时相 随卵黄颗粒逐渐吸收, 卵母细胞成空瘪状结构; 卵巢体积缩小。

同一批次取样时, 尼罗罗非鱼不同个体间卵巢发育程度不一致(表 2)。例如, 5 月 21 日取样时, 发现 III 时相雌鱼 3 尾, IV 时相 4 尾, V 时相仅 1 尾; 至 6 月 6 日取样时, V 时相雌鱼增加至 5 尾, VI 时相 1 尾, IV 时相 2 尾。同一个体卵巢内部卵母细胞发育程度也不一致, 一般都存在 2 种以上时相的卵母细胞(图 1)。

2.2 性腺指数变化

尼罗罗非鱼卵巢发育不同时期性腺指数(GSI)的变化情况如表 3 所示。卵巢从 II 时相发育至 V 时相期间, GSI 值随卵巢重量增加而不断升高, 至 V 时相时达到峰值(3.93 $\pm$ 0.38), 显著性高于成熟前发育各期; 至 VI 时相时, GSI 值又显著性下降。

2.3 血清中性类固醇激素含量变化

卵巢发育期间, 血清中 E_2 、P 含量均表现为先升高、后降低的变化趋势(表 4)。II 时相时, E_2 含量较低, (275.17 $\pm$ 58.16) ng/L; 随着卵巢不断成熟发育, 含量开始显著上升, IV 时相时达到峰值 (1271.96 $\pm$ 143.45) ng/L; 自 V 时相开始, 含量显著下降; VI 时相时, 含量进一步下降。P 含量在卵巢 II 时相时最低, (2.87 $\pm$ 1.51) ng/mL; 随着卵巢不断成熟发育, 含量开始显著上升, V 时相时升至最大值(21.62 $\pm$ 4.95) ng/mL; VI 时相时, 含量又显著 ($P<0.05$)下降。

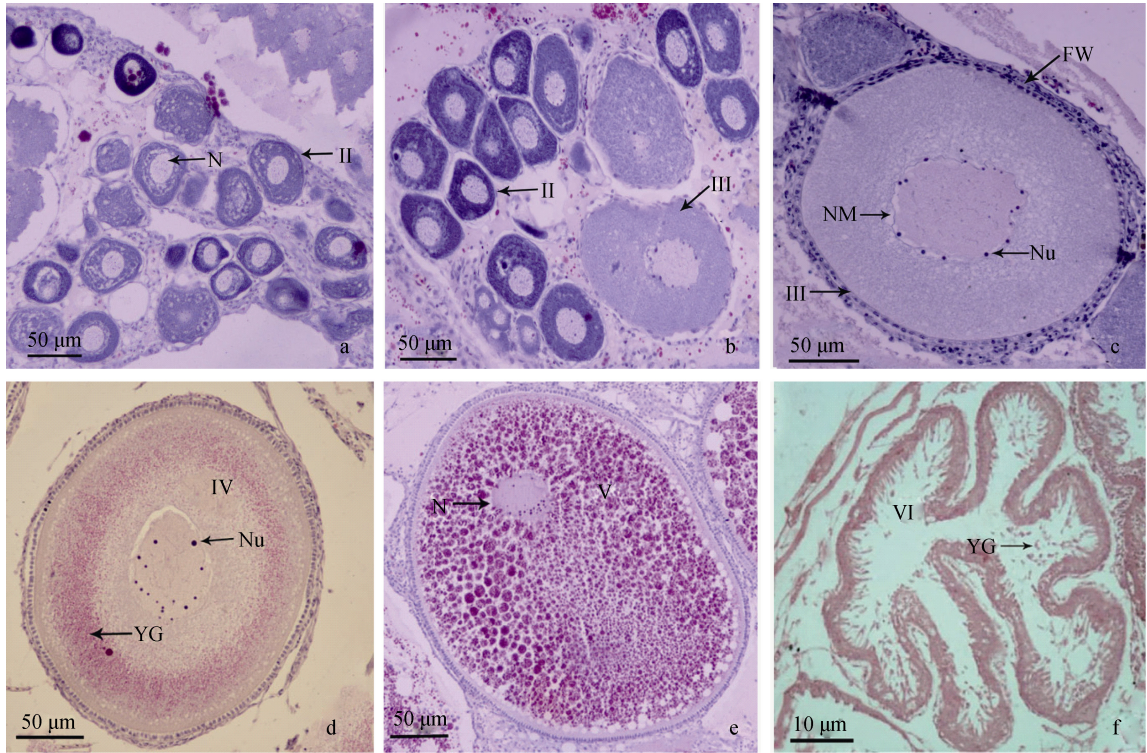


图 1 尼罗罗非鱼不同发育时相卵母细胞

a: II 时相卵母细胞; b: II 时相和 III 时相卵母细胞; c: III 时相卵母细胞; d: IV 时相卵母细胞; e: V 时相卵母细胞; f: VI 时相晚期卵母细胞. FW: 滤泡膜; N: 细胞核; NM: 核膜; Nu: 核仁; YG: 卵黄颗粒.

Fig. 1 Oocytes at different developmental stages of *Oreochromis niloticus*

a: Oocytes of phase II; b: Oocytes of phase II and phase III; c: The oocyte of phase III; d: The oocyte of phase IV; e: The oocyte of phase V; f: The oocyte of late phase VI. FW: Follicle membrane; N: Nucleus; NM: Nuclear membrane; Nu: Nucleolus. YG: Yolk globules.

表 2 各期采样中尼罗罗非鱼不同个体卵巢发育

Tab. 2 Different individuals of *Oreochromis niloticus* at developmental phases in each sampling

采样时间 sampling time	样本数 sample number	II 时相 phase II	III 时相 phase III	IV 时相 phase IV	V 时相 phase V	VI 时相 phase VI
2014.05.01	8	8	—	—	—	—
2014.05.06	8	6	2	—	—	—
2014.05.11	8	4	3	1	—	—
2014.05.16	8	2	4	2	—	—
2014.05.21	8	—	3	4	1	—
2014.05.26	8	—	2	3	3	—
2014.06.01	8	—	1	3	4	—
2014.06.06	8	—	—	2	5	1
2014.06.12	8	—	—	1	2	5

注: “—”表示未观察到该时相个体.

Note: “—” represents no individuals at this phase.

2.4 卵巢发育不同时期肝、血清、卵巢中 Vtg 含量变化

肝、血清及卵巢中 Vtg 含量随卵巢成熟发育均表现为先上升后下降的变化趋势(图 2)。II 时相

时, 各组织中 Vtg 含量均为最低水平, 自 III 时相开始, Vtg 含量开始显著上升。其中, 肝 Vtg 含量在 IV 时相时达最大值 $[(8.33\pm0.26)\text{ mg/L}]$, 血清、卵巢中 Vtg 含量均在 V 时相时达最大值[分别为

表 3 尼罗罗非鱼卵巢发育不同时期性腺指数(GSI)
Tab. 3 Gonadosomatic index (GSI) at different ovary developmental stages of *Oreochromis niloticus*

卵巢时期 ovary period	体长/cm body length	体重/g body weight	卵巢重/g ovary weight	性腺指数 GSI gonadosomatic index
II	18.44±1.17 ^a	311.04±8.03 ^a	4.55±1.33 ^a	1.56±0.62 ^a
III	19.17±1.41 ^a	316.35±7.65 ^a	7.31±1.12 ^b	2.44±0.36 ^b
IV	19.53±1.62 ^{ab}	338.90±7.23 ^b	11.21±1.83 ^c	3.22±0.21 ^{bc}
V	20.12±1.39 ^b	356.76±8.71 ^c	13.84±2.07 ^c	3.93±0.38 ^c
VI	20.23±1.21 ^b	344.61±7.47 ^{bc}	7.21±1.24 ^b	1.96±0.43 ^a

注: 表中同一列数据中不同字母上标表示显著性差异($P<0.05$).
Note: Different superscripts in the same column donate significant differences ($P<0.05$).

表 4 尼罗罗非鱼卵巢发育不同时期血清中 E_2 、P 激素含量变化
Tab. 4 Changes of E_2 and P contents in blood serum at different gonad developmental stages of *Oreochromis niloticus*

卵巢时期 ovary period	雌二醇/(ng·L ⁻¹) E_2	孕酮/(ng·mL ⁻¹) P
II	275.17±58.16 ^a	2.87±1.51 ^a
III	775.71±53.31 ^b	6.82±1.25 ^b
IV	1271.96±143.45 ^c	13.12±0.67 ^c
V	706.45±78.65 ^b	21.62±4.95 ^d
VI	314.12±79.51 ^a	6.71±1.35 ^b

注: 表中同一列数据中不同字母上标表示显著性差异($P<0.05$).
Note: Different superscripts in the same column donate significant differences ($P<0.05$).

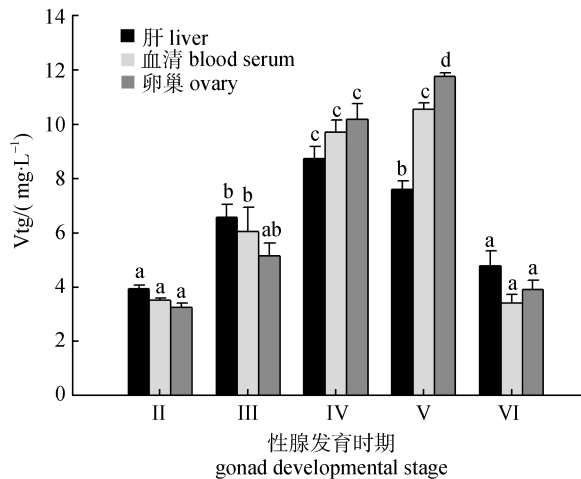


图 2 尼罗罗非鱼卵巢发育不同时期肝、血清、卵巢中 *Vtg* 含量变化
柱上不同字母表示各时相间差异性显著($P<0.05$).

Fig. 2 Changes of *Vtg* content in liver, blood serum and ovary at different gonad developmental stages of *Oreochromis niloticus*
Columns with different letters mean significant differences ($P<0.05$) among groups.

(9.55±0.74) mg/L、(11.77±0.34) mg/L], 但 IV 时相血清中 *Vtg* 含量[(8.78±0.57) mg/L]与 V 时相差异不显著($P>0.05$)。排卵之后, 各组织中 *Vtg* 含量均显著性下降。卵巢发育至 II 时相、III 时相期间, 肝中 *Vtg* 含量最高; 发育至 IV 时相、V 时相期间, 卵巢中的 *Vtg* 含量最高; 排卵后, 肝中 *Vtg* 含量相对较高, 但与血清及卵巢中的含量差异不显著。

2.5 卵巢发育不同时期肝、卵巢中 *Vtg* mRNA 表达变化

肝中 *Vtg* mRNA 表达水平在卵巢 II 时相时较低, III 时相时迅速上升并到达峰值(1.146±0.148); 自 IV 时相开始, 表达水平逐渐下降, 但与 III 时相之间差异不显著, V 时相开始显著性下降。卵巢中 *Vtg* mRNA 表达量明显低于肝, 自卵巢 II 时相开始缓慢增加, V 时相时达峰值(0.261±0.023), 但增长趋势不显著($P>0.05$), VI 时相时, 表达水平显著下降(图 3)。

3 讨论

3.1 尼罗罗非鱼卵母细胞和卵巢发育特征及性腺指数变化

鱼类生殖是周期性生理活动。根据卵母细胞发育特征, 卵巢发育可分为完全同步、部分同步、非同步 3 种类型^[17]。本研究中, 尼罗罗非鱼卵母细胞从 II 时相发育至 VI 时相的组织特征变化(包括卵黄结构、卵径大小、核仁变化等), 与早期学者的观察描述大致相同^[8, 18]。同时, 我们观察到卵巢 IV 期卵黄颗粒显著增加, 其积累方式是由外层向中央逐渐增加。根据我们分期采样的结果分析,

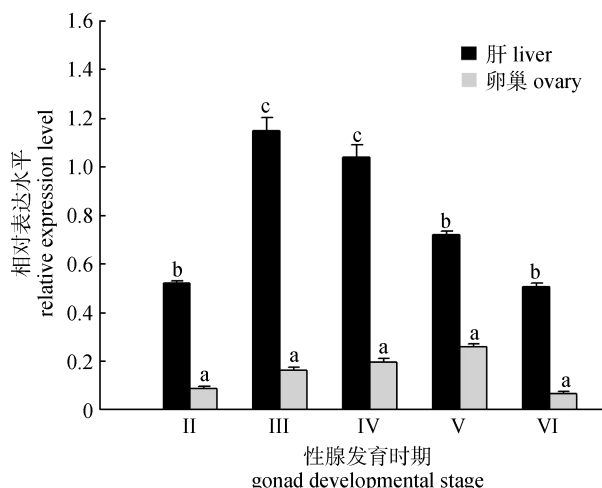


图 3 尼罗罗非鱼卵巢发育不同时期肝、卵巢中 Vtg mRNA 相对表达

柱上不同字母表示各组间差异性显著($P < 0.05$)。

Fig. 3 Relative expression of Vtg mRNA in ovary and liver at different gonad developmental stages of *Oreochromis niloticus*. Columns with different letters mean significant differences ($P < 0.05$) among groups.

不同批次及同一批次取样的不同个体卵巢内卵母细胞发育的特征存在显著差异。5 月中上旬, 尼罗罗非鱼刚从室内温棚(20℃左右)转移到室外养殖, 性腺发育迟缓, 以 II 时相、III 时相的雌鱼为主; 5 月下旬及 6 月初, 温度升高, 摄食量开始增加, 营养物质累积几乎全部用于卵巢发育, 多以 IV 时相、V 时相的成熟雌鱼为主。与同步产卵鱼类成熟系数只出现一次高峰期、一次性产卵不同^[19-20], 仅在 6 月初的连续两次采样中, 就发现尼罗罗非鱼形成两个产卵峰期, 进一步证实了尼罗罗非鱼卵巢的非同步发育特征。

性腺指数(GSI)是评价鱼类性腺发育的重要指标, 可间接反映亲鱼性腺成熟程度^[21]。本研究中, 5 月初, 尼罗罗非鱼刚转移到室外养殖, 卵巢重量小, GSI 值偏低; 5 月中下旬, 温度升高, 摄食量开始增加, 卵巢重量显著增加, GSI 值也随之迅速升高; 6 月中上旬, 雌鱼开始产卵, 由于成熟卵细胞大量排出, 卵巢重量减少, GSI 值显著降低($P < 0.05$)。繁殖前期, 尼罗罗非鱼 GSI 随卵巢发育加快而增大, 至产卵前到达峰值; 繁殖后期, GSI 随产卵结束而迅速下降。GSI 值与卵巢成熟发育间呈同步性变化, 这与其他同步性鱼类中性腺规

律的变化基本一致^[22]。

3.2 血清性类固醇激素含量变化

鱼类卵巢分泌的性类固醇激素主要包括雌二醇(E_2)、孕酮(P)等, 不同发育时期激素分泌水平不同^[23]。本研究中, 尼罗罗非鱼 E_2 含量自卵巢 II 期开始显著升高, IV 期达到峰值, V 期后显著下降。P 含量自卵巢 II 期开始呈现不断升高趋势, V 期到达峰值, VI 期后开始显著下降。可见, 尼罗罗非鱼卵巢成熟过程与性类固醇激素(E_2 、P)含量变化之间存在密切联系。

研究证明, 卵巢生长发育阶段, GtH 可刺激滤泡细胞和颗粒细胞共同合成 E_2 , E_2 诱导肝合成卵黄蛋白原, 进而促进卵巢卵黄发生^[24]。研究发现, 石斑鱼(*Epinephelus coioides*)^[25]和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[26]血清中 E_2 水平均随卵黄积累而不断上升, 产卵后 E_2 含量显著性下降。本研究也发现尼罗罗非鱼在卵母细胞小生长期(III 期) E_2 浓度就开始升高, 在卵母细胞大生长期(IV 期)时升至最高峰, 而在卵母细胞成熟期(V 期)时却开始下降, 排卵(VI 期)后显著下降, 说明 E_2 主要在卵巢成熟发育前期(即卵黄积累阶段)起主要作用, 促进卵母细胞的生长和卵黄的积累。P 分泌水平与卵母细胞成熟有关, 它首先被转化为 17α -羟孕酮(17α -OHP), 后者再被转化为 17α , 20β -双羟孕酮(17α , 20β -DHP), 进而诱导卵母细胞最后成熟和排卵, 是大多数鱼类的成熟诱导激素(MIH)^[27-28]。Desouza 等^[29]对卵巢成熟期尼罗罗非鱼雌鱼腹腔注射等剂量的 17α , 20β -DHP 和生理盐水后, 发现雄鱼对注射组雌鱼的追逐频率明显高于对照组。本研究中 P 含量在卵巢发育的 IV 期开始升高, V 期升至最高峰, 高水平维持至排卵结束, 排卵后含量显著下降, 说明 P 能够参与诱导尼罗罗非鱼卵母细胞最后成熟及排卵, 但其诱导卵子成熟的具体作用机制还不清楚, 有待进一步研究。

3.3 不同发育时期肝、血清、卵巢中 Vtg 含量变化

卵黄蛋白原(Vtg)是一种特异存在于性成熟卵生非哺乳动物血液中的蛋白, 是几乎所有卵生动物中卵黄蛋白的前体^[30]。本研究对不同发育时期尼罗罗非鱼肝、血清及卵巢中 Vtg 含量进行测定,

结果显示, 肝中 *Vtg* 含量先升、后降, 在 IV 期时达最大值; 血清中 *Vtg* 含量自 II 期开始不断增加, V 期达峰值, 排卵后显著降低; 卵巢中 *Vtg* 含量也表现为 V 期达最大值, 产卵后显著降低的趋势。说明肝、血清及卵巢中 *Vtg* 含量变化与卵巢成熟发育间存在密切关联。

首先, 肝中 *Vtg* 含量之所以出现先升高后降低的变化趋势, 是因为在卵巢成熟发育早期(II 期、III 期), 尼罗罗非鱼肝合成 *Vtg* 相对旺盛, 其含量不断升高, 至 IV 期时达最大值; 卵巢发育后期(V 期), 当 *Vtg* 合成与积累到一定水平时, 可通过负反馈调节机制, 抑制肝 *Vtg* 合成, 肝中 *Vtg* 合成逐渐减弱, 含量也随之下降, 这一特征与李加敏等^[31]在对河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophila*)雌鱼性成熟过程中, 肝中 *Vtg* 含量变化的描述相似。至排卵结束后(VI 期), 我们发现肝中 *Vtg* 含量虽然降低, 但仍维持一定的分泌水平, 推测这可能受尼罗罗非鱼自身生殖生理的调节, 等待下一次成熟周期^[32]。其次, 血清中 *Vtg* 含量的变化在生殖周期内也呈现明显的波动趋势, 卵母细胞大生长期(IV 期)时含量就显著升高, 持续到卵母细胞成熟(V 期)并达最大值, V 期与 IV 期中 *Vtg* 含量差异不显著, 这与哲罗鲑(*Hucho tainen*)^[33]、斑鳅(*Siniperca scherzeri*)^[34]血清中 *Vtg* 含量在卵巢发育 V 期显著性升高不同, 可能是由于尼罗罗非鱼卵母细胞非同步发育所致。最后, 卵巢中 *Vtg* 含量随卵母细胞的生长也逐渐增加, 尤其是从 III 期到 IV 期, *Vtg* 含量增加了 1 倍左右, 可见这个时期其卵黄沉积速度最快, 这个阶段正好是卵母细胞生长的重要时期, *Vtg* 营养物质的积累几乎全部用于其生长; 从 IV 期到 V 期 *Vtg* 含量增加趋势也较明显, 这与同步性产卵鱼类卵巢 *Vtg* 含量变化基本一致^[35]。

3.4 不同发育时期肝、卵巢中 *Vtg* mRNA 表达变化

许多动物的卵黄蛋白合成并非只是单一的内源性或外源性合成, 而是既有内源性合成也有外源性合成, 通常在不同发育时期卵黄蛋白合成的部位也不同^[4]。在斑马鱼(*Danio rerio*)和虹鳟的研究中发现, 除肝合成 *Vtg* 之外, 脂肪组织中也检

测到 *Vtg* 的表达与翻译^[36]。Liu 等^[37]证实了斑马鱼卵巢滤泡细胞也可合成 *Vtg*, 表明鱼类也具有 *Vtg* 内源性合成途径。本研究中, 尼罗罗非鱼卵巢发育不同时期肝、卵巢中均检测到 *Vtg* mRNA 的表达。肝中 *Vtg* mRNA 表达水平随卵巢发育先升高, 在 III 期达最大值, 但与 IV 期差异不显著, IV 期后开始持续降低, 这与肝中 *Vtg* 含量及血清中 E_2 的变化规律基本一致, 在卵母细胞生长期, E_2 浓度升高, 可诱导肝中 *Vtg* mRNA 表达水平增加, *Vtg* 含量相应升高; 随着卵黄不断积累升高, E_2 浓度逐渐下降, 肝中 *Vtg* mRNA 水平也逐渐下降, 这与其他鱼类研究结果基本相似^[38]。卵巢中 *Vtg* mRNA 表达水平显著偏低, 随卵巢发育, 表达水平不断升高, 在 V 期达最大, 但与其他各期差异不显著, 排卵后, 表达水平又逐渐降低, 表明卵巢自身也可合成少量的 *Vtg*, 并在卵母细胞成熟期时达到最高水平, 卵巢 *Vtg* 的表达机制及其生理调节作用尚不清楚, 有待进一步探究。

肝、卵巢 *Vtg* mRNA 相对表达水平结果表明:

(1)肝、卵巢中均有 *Vtg* mRNA 表达, 推测它们同是 *Vtg* 的合成器官; (2)从相对表达水平上看, 肝是 *Vtg* 合成的主要器官, 在卵黄积累阶段最为活跃, 而卵巢 *Vtg* 合成相对较弱; (3)肝、卵巢中 *Vtg* mRNA 表达时序与其 *Vtg* 含量变化规律基本一致, 即在卵黄积累前期不断升高, 到达峰值后显著下调, 转录水平上可能也存在类似于蛋白水平的负反馈调节机制。

参考文献:

- [1] Lin H R. Physiology of Fishes[M]. Guangzhou: Guangdong Higher Education Press, 1999: 146–240. [林浩然, 鱼类生理学[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 1999: 146–240.]
- [2] Chen J, Hu W, Zhu Z Y. Progress in studies of fish reproductive development regulation[J]. Chinese Science Bulletin, 2013, 58(2): 103–114. [陈戟, 胡炜, 朱作言. 鱼类生殖发育调控的研究进展[J]. 科学通报, 2013, 58(2): 103–114.]
- [3] Merson R R, Casey C S, Martinez C, et al. Oocyte development in summer flounder: seasonal changes and steroid correlates[J]. J Fish Biol, 2000, 57(2): 182–196.
- [4] Zhang S C, Sun X T, Li H Y. Review on vitellogenin[J]. Marine Science, 2002, 26(7): 32–35. [张士瑾, 孙旭彤, 李

- 红岩. 卵黄蛋白原研究及其进展[J]. 海洋科学, 2002, 26(7): 32–35.]
- [5] Leonardi M, Vera J, Tarifeño E, et al. Vitellogenin of the Chilean flounder *Paralichthys adspersus* as a biomarker of endocrine disruption along the marine coast of the South Pacific. Part I: induction, purification, and identification[J]. Fish Physiol Biochem, 2010, 36(3): 757–765.
- [6] Li J L, Li S F. Introduction and research advances of *Oreochromis niloticus* in China Mainland[J]. Journal of Fisheries of China, 2001, 25(1): 90–95. [李家乐, 李思发. 中国大陆尼罗罗非鱼引进及其研究进展[J]. 水产学报, 2001, 25(1): 90–95.]
- [7] Chen X H, Liu X C, Meng Z N, et al. Ontogenetic development and gonadal differentiation and development of larvae Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Journal of Tropical Organisms, 2012, 3(3): 197–203. [陈兴汉, 刘晓春, 蒙子宁, 等. 尼罗罗非鱼仔鱼个体发育及性腺分化的发育[J]. 热带生物学报, 2012, 3(3): 197–203.]
- [8] Liu Y, Liu G A, Chen S Q, et al. Studies on the gonadal development of *Oreochromis niloticus*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1983, 8(1): 17–32. [刘筠, 刘国安, 陈淑群, 等. 尼罗罗非鱼性腺发育的研究[J]. 水生生物学集刊, 1983, 8(1): 17–32.]
- [9] Lan H Z, Zhao F J. A preliminary research in the reproductive ecology of *Oreochromis niloticus* Linnaeus[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 1988, 9(2): 54–58. [蓝厚珍, 赵福江. 尼罗罗非鱼生殖生态的初步研究[J]. 海洋湖沼通报, 1988, 9(2): 54–58.]
- [10] Tao W J, Yuan J, Zhou L Y, et al. Characterization of gonadal transcriptomes from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reveals differentially expressed genes[J]. PloS ONE, 2013, 8(5): e63604.
- [11] Wang D S, Zhou L Y, Kobayashi T, et al. Doublesex- and Mab-3-related transcription factor-1 repression of aromatase transcription, a possible mechanism favoring the male pathway in tilapia[J]. Endocrinology, 2010, 151(3): 1331–1340.
- [12] Hirai T, Oba Y, Yao Z X, et al. Putative gonadotropin receptors in tilapia (*Oreochromis niloticus*) gonads: cDNA cloning and expression during oogenesis[C]. Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Norway: Bergen, 2000, 201.
- [13] Ndiaye P, Forgue J, Lamothe V, et al. Tilapia (*Oreochromis niloticus*) vitellogenins: development of homologous and heterologous ELISAs and analysis of vitellogenin pathway through the ovarian follicle[J]. J Exp Zool Part A, 2006, 305A(7): 576–593.
- [14] Lazier C B, Langley S, Ramsey N B, et al. Androgen inhibition of vitellogenin gene expression in tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Gen Comp Endocrinol, 1996, 104(3): 321–329.
- [15] Chen S L, Deng W T, He L, et al. Elisa-receptor assay for testing the bioactivity of fish growth hormone[J]. Journal of Fisheries of China, 1995, 19(3): 217–224. [陈松林, 邓文涛, 贺路, 等. 用酶联免疫吸附受体法检测鱼类生长激素的生物活性[J]. 水产学报, 1995, 19(3): 217–224.]
- [16] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [17] Tyler C R, Sumpter J P. Oocyte growth and development in teleosts[J]. Rev Fish Biol Fish, 1996, 6(3): 287–318.
- [18] Wang L L, Qiu Q R, Wu F H. Studies on the gonadal development of *Oreochromis niloticus*[J]. Freshwater Fisheries, 1986, 15(4): 1–4. [王令玲, 仇潜如, 吴福煌. 尼罗罗非鱼性腺发育的研究[J]. 淡水渔业, 1986, 15(4): 1–4.]
- [19] Zhang Y G, Xie X J. Reproductive biology of *Silurus meadionalis*: The development and annual change in the gonads[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1996, 20(1): 8–14. [张耀光, 谢小军. 南方鲇的繁殖生物学研究: 性腺发育及周年变化[J]. 水生生物学报, 1996, 20(1): 8–14.]
- [20] Yue Z X, Gao S T, Deng F J, et al. A histological study on the ovary development of *Channa Argus*[J]. Journal of Wuhan University: Natural Science Edition, 1996, 42(2): 225–232. [岳朝霞, 高书堂, 邓凤娇, 等. 乌鳢卵巢发育的组织学研究[J]. 武汉大学学报: 自然科学版, 1996, 42(2): 225–232.]
- [21] Rösch R. Gonadosomatic index (GSI) of female whitefish (*Coregonus lavaretus*) in Lake Constance[J]. Limnologica, 2000, 30(2): 193–196.
- [22] Lee W K, Yang S W. Relationship between ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones, and induction of oocyte maturation and ovulation in the cultured female Korean spotted sea bass *Lateolabrax maculatus* (Jeom-nong-eo)[J]. Aquaculture, 2002, 207(1–2): 169–183.
- [23] Onuma T, Higashi Y, Ando H, et al. Year-to-year differences in plasma levels of steroid hormones in pre-spawning chum salmon[J]. Gen Comp Endocrinol, 2003, 133(2): 199–215.
- [24] Holland M C, Hassin S, Zohar Y. Gonadal development and plasma steroid levels during pubertal development in captive-reared striped bass, *Morone saxatilis*[J]. J Exp Zool, 2000, 286(1): 49–63.
- [25] Zhao H H, Liu X C, Lin H R, et al. Seasonal cycles of ovarian development and serum sex steroid level of female grouper *Epinephelus coioides*[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2003, 42(6): 56–63. [赵会宏, 刘晓春, 林浩然, 等. 斜带石斑鱼雌鱼卵巢发育与血清性类固

- 醇激素的生殖周期变化[J]. 中山大学学报, 2003, 42(6): 56–63.]
- [26] Scott A P, Sumpter J P, Hardiman P A. Hormone changes during ovulation in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson)[J]. Gen Comp Endocrinol, 1983, 49(1): 128–134.
- [27] Comeau L A, Campana S E, Chouinard G A, et al. Timing of Atlantic cod *Gadus morhua* seasonal migrations in relation to serum levels of gonadal and thyroidal hormones[J]. Mar Ecol Prog Ser, 2001, 221: 245–253.
- [28] Bhattacharyya S, Sen U, Bhattacharyya S P, et al. High performance liquid chromatographic separation of steroids from ovarian follicles of fresh water perch *Anabas testudineus*: identification and characterization of the maturation-inducing hormone[J]. J Exp Zool, 2002, 292(6): 565–572.
- [29] de Souza S M G, Lucion A B, Wassermann G F. Influence of 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one injected into a post-ovulatory female on the reproductive behavior of male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Comp Biochem Physiol A-Mol Integr Physiol, 1998, 119(3): 759–763.
- [30] Utarabhand P, Bunlipatanon P. Plasma vitellogenin of grouper (*Epinephelus malabaricus*): Isolation and properties[J]. Comp Biochem Physiol C: Pharmacol Toxicol Endocrinol, 1996, 115(2): 101–110.
- [31] Li J M, Zhu J J, Yang W, et al. The variation of the VTG level in the process of sexual maturity of the female fish of *Odontobutis potamophila*[J]. Journal of Chongqing Normal University: Natural Science, 2013, 30(2): 17–21. [李加敏, 朱嘉洁, 杨崴, 等. 河川沙塘鳢雌性成熟过程中卵黄蛋白原含量变化[J]. 重庆师范大学学报: 自然科学版, 2013, 30(2): 17–21.]
- [32] Coward K, Bromage N R, Little D C. Inhibition of spawning and associated suppression of sex steroid levels during confinement in the substrate-spawning *Tilapia zillii*[J]. J Fish Biol, 1998, 52(1): 152–165.
- [33] Wang F, Zhang Y, Tong G X, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of vitellogenin during reproductive cycle of taimen (*Hucho taimen*)[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2009, 18(6): 673–679. [王风, 张颖, 佟广香, 等. 哲罗鲑生殖周期中血清卵黄蛋白原浓度的 ELISA 检测[J]. 上海海洋大学学报, 2009, 18(6): 673–679.]
- [34] Yang W, Zhao J L, Deng Y F, et al. A preliminary study on the relationship between ovary development and the content changes of serum phosphoprotein of *Siniperca scherzeri*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2010, 19(2): 162–166. [杨武, 赵金良, 邓燕飞, 等. 斑鲈卵巢发育与血清蛋白磷含量变化关系的初步分析[J]. 上海海洋大学学报, 2010, 19(2): 162–166.]
- [35] Rideout R M, Morgan M J, Lambert Y, et al. Oocyte development and vitellogenin production in Northwest Atlantic Greenland Halibut *Reinhardtius hippoglossoides*[J]. J Northw Atl Fish Sci, 2012, 44: 15–29.
- [36] Tingaud-Sequeira A, Knoll-Gellida A, André M, et al. Vitellogenin expression in white adipose tissue in female teleost fish[J]. Biol Reprod, 2012, 86(2): 38, 1–11.
- [37] Liu K C, Wu R S S, Ge W. Luteinizing hormone receptor (*lhcr*) as a marker gene for characterizing estrogenic endocrine-disrupting chemicals in zebrafish ovarian follicle cells[J]. Gen Comp Endocrinol, 2013, 192: 89–94.
- [38] Perazzolo L M, Coward K, Davail B, et al. Expression and localization of messenger ribonucleic acid for the vitellogenin receptor in ovarian follicles throughout oogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. Biol Reprod, 1999, 60(5): 1057–1068.

Changes in sex steroid hormones, vitellogenin content, and *Vtg* mRNA expression during ovarian development in *Oreochromis niloticus*

LUO Mingkun, ZHAO Jinliang, Thammaratsuntorn Jeerawat, LI Chuanyang, WEI Jihai, ZHAO Yonghua

Laboratory of Freshwater Fisheries Germplasm Resources, Ministry of Agriculture; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Tilapia feature asynchronous oocyte development and batch spawning. We conducted this study to further understand ovarian maturation and the physiological mechanisms involved in non-synchronous spawners, such as tilapia. Changes in sex steroid hormones (estradiol-17 β [E₂] and progesterone [P]), vitellogenin (Vtg) levels, and *Vtg* mRNA expression were studied during ovarian development in *Oreochromis niloticus* using histological, enzyme-linked immunoassay, and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction methods, respectively. The results showed that the gonadosomatic index (GSI) of *O. niloticus* paralleled ovarian development and peaked at stage V. Serum E₂ levels increased significantly beginning at stage II, peaked at stage IV, then decreased significantly at stage V, whereas P levels increased gradually beginning at stage II, peaked at stage V, and decreased significantly at stage VI. Hepatic *Vtg* content increased initially, decreased, and then peaked at stage IV. Serum and ovarian Vtg contents increased gradually beginning at stage II, peaked at stage V, and decreased significantly at stage VI. Hepatic *Vtg* mRNA expression peaked at stage III and decreased gradually at stage IV. Ovarian *Vtg* mRNA expression was relatively lower and peaked at stage V. These results indicate that E₂ and P play different roles during the early and late ovarian developmental stages, respectively. A close correlation was detected between changes in Vtg content in different tissues and ovarian maturation. *Vtg* mRNA from the liver and ovary were involved in Vtg synthesis; the liver is the major synthetic organ active during the yolk accumulation phase, but ovarian Vtg synthesis was relatively low. We provide some basic data to further explore the endocrine regulatory mechanisms in non-synchronous spawning fish.

Key words: *Oreochromis niloticus*; ovarian development; sex steroid hormone; vitellogenin; *Vtg* mRNA

Corresponding author: ZHAO Jinliang. E-mail: jlzha@shou.edu.cn