

文章编号:1005-8737(2001)02-0044-04

注射含 HCG 和 CPE 的 W/O/W 复乳诱导 日本鳗鲡性腺发育成熟的研究

邓岳松¹, 林浩然², 谢 骏³, 潘德博³, 王广军³, 许梓荣¹

(1. 浙江大学饲料科学研究所, 浙江 杭州 310029; 2. 中山大学 生命科学学院,
广东 广州 510275; 3. 中国水产科学研究院 珠江水产研究所, 广东 广州 510380)

摘 要:用含 HCG 及鲤脑垂体(PG)匀浆液提取物(CPE)的 W/O/W 复乳,对培养雌鳗进行注射催熟实验。雌鳗平均 GSI 达 35.18%,最高达 56.5%,其催熟效果较常规注射方法(平均 GSI 27.9%,最高 50.4%)好。用含 LHRH-A、HCG、CPE 的复乳和 DOM 生理盐水混悬剂对部分达到性成熟的鳗鲡进行催产,用 W/O/W 复乳诱导成熟的鳗鲡,排卵率为 75%;用常规方法催熟的鳗鲡排卵率为 55%。注射复乳制剂后,鳗鲡血清 GtH 含量可较长时间的保持较高水平,血清 GtH 的变化较常规注射方法缓和。注射乳剂还可使鳗鲡脑垂体 GtH 含量升高。

关键词:W/O/W 复乳;日本鳗鲡;性腺发育;催熟;催产
中图分类号:S961.2 **文献标识码:**A

鱼类人工繁殖的传统方法主要是将激素溶解或混悬在水溶液中注射亲鱼,如催熟鳗鲡常用的方法是注射含 HCG 和 CPE 的溶液^[1,2]。外源激素进入鱼体后,将很快被鱼体吸收,代谢清除^[3,4],这不利于某些需长期用外源激素催熟的鱼类,因此有必要开发新的方法来延长激素的作用时间。

复乳具有两层或多层液体乳膜结构,可有效控制药物的扩散,起到药库的作用。其中水/油/水(W/O/W)乳剂可将水溶性药物包裹于内水相,使药物避免与体液或组织液接触,减少降解,提高药物的利用度。适宜的复乳系统可延缓药物的释放,具有缓释和控释作用。

日本学者 Sato 等^[5]用含鳗脑垂体匀浆液复乳制剂催熟鳗鲡,获得较好效果,但其所配制的复乳需

先将 16 烷酸酐与明胶结合形成脂化明胶,制备麻烦,方法复杂,限制了推广应用。本研究试图在我国传统催熟方法的基础上,通过制备一种简单、材料便宜的 W/O/W 复乳以减缓 HCG 和 CPE 在日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)体内的释放速度,从而达到较好的催熟效果。

1 材料与方法

1.1 材料

日本鳗鲡于 2000 年 1 月购自广州番禺,共 115 尾,皆为雌性。体重 330~680 g;体长 62~87 cm。暂养于珠江水产研究所深圳盐田基地,天然海水,盐度 30~34。实验期间均不投喂,自然水温(14~25℃)和光照。

1.2 催熟实验

1.2.1 含 HCG 和 CPE 的 W/O/W 乳剂的配制
按邓岳松的方法^[6],将鲤脑垂体提取液(Carp pituitary extraction, CPE)与 HCG 配成内水相,即将 5~10 个鲤脑垂体加入适量无菌双蒸水后用超声波匀

收稿日期:2000-09-01

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770101);国家“九五”攻关
专题项目(96-008-01-01-01)

作者简介:邓岳松(1967-),男,讲师,博士,从事水生生物繁殖及营养的研究。

浆器匀浆,将匀浆液在 4℃,200 g 离心 10 min,取上清液即得 CPE,在上清液中加入适量 HCG,即得内水相。将内水相与适量乳化剂混合后以体积比 1:2 加入精制大豆油中,超声乳化 3 min 得 W/O 初乳,将之以适当比例加入含 1% Tween80 及 1% 聚乙烯醇的外水相中,超声乳化数分钟得 W/O/W 复乳。由图 1 可见按此方法制备的复乳乳滴大多呈多子母囊型,多数乳滴含几个到十几个小乳滴,以“B 型”复乳为主,小乳滴中的激素要释放出来,必须通过油相,从而起到缓释和控释的作用。乳滴粒径大部分在 1~15 μm 之间,平均直径为 13.78 μm ,分布较均匀,HCG 与 CPE 平均包封率为 92.2%。

1.2.2 处理组设计 将鱼分为 3 组,即 A 组(45 尾)注射 W/O/W 复乳剂,每次每尾注射的乳剂内含 2 mg CPE 与 100 IU HCG,7 d 注射 1 次,共注射 12 次;B 组(45 尾)按常规方法注射脑垂体(CP)匀浆液+HCG;C 组(15 尾)为对照组,注射 Ringer 氏液。以上各组各设 2 个重复,注射部位都是背部肌肉。

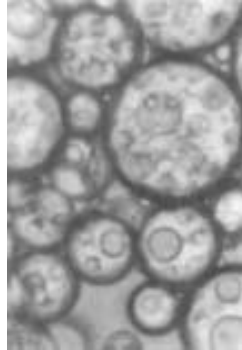


图 1 示含激素的小水滴在油相的包裹中($\times 250$)

Fig.1 Showing water droplet enwrapped in oil

1.2.3 性腺与脑垂体取样与保存 3 组鳊鲱在激素处理后 90 d 全部解剖取性腺,计算性腺成熟系数

(GSI)。在取性腺的同时取脑垂体,后者 -25℃ 保存待测 GtH。

1.2.4 血清取样与保存 在第 12 次注射乳剂前及注射乳剂后 3 h、12 h、24 h、48 h、3 d、7 d、10 d 随机从实验组 8 尾鳊鲱和对照组 5 尾鳊鲱的尾部抽血,4℃ 放置 4 h 后,1 000 r/min 离心 5 min,取上清(血清),-25℃ 保存。

1.2.5 GtH 的测定 脑垂体和血清 GtH 的放射免疫测定参照 Lin 等^[7]的方法。脑垂体测定前加入 1 mg/ml 的巴比妥钠缓冲液,用超声波匀浆器匀浆。

1.3 催产实验

对 A、B 组性腺发育较好的亲鱼各 20 尾进行诱导排卵实验。注射含 LHRH-A、CPE、HCG 的乳剂及 DOM。乳剂配制方法同 1.2.1;DOM 在研钵中研磨后,混悬在 Ringer's 液中注射。激素分 2 次注射,第 1 次注射剂量为每公斤体重 10 μg LHRH-A + 1 mg CPE + 100 IU HCG + 1 mg DOM。第 2 次注射时间间隔为 24 h,每公斤体重的注射剂量为 50 μg LHRH-A + 5 g CPE + 1 000 IU HCG + 5 mg DOM。两次注射部位都是背部肌肉。

1.4 数据处理

数据用平均值 $\pm$ 标准差表示,2 个平均值之间的差异用 Student's *T* 检验,2 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。

2 结果与分析

2.1 亲鱼性腺发育情况

用 W/O/W 乳液处理 90 d 后(注射 12 次)鳊鲱 GSI 的变化情况见表 1。从表 1 看,对照组性腺没有发育;A 组的平均 GSI 比 B 组高,两组的 GSI 存在显著差异($P < 0.05$);注射乳剂的 A 组性腺发育情况比 B 组要好。

表 1 雌鳊的性腺成熟系数

Table 1 The GSI of female *A. japonica* 90 d after injection

处理组 Treatment	尾数 Nos.	平均 GSI/% Average GSI	GSI < 20 % Nos.	20 < GSI < 35 % Nos.	GSI > 35 % Nos.	最高 GSI/% Highest GSI
A	30	35.18 $\pm$ 13.2 ^a	5	8	17	56.5
B	30	27.97 $\pm$ 12.6 ^b	8	12	10	50.4
C	15	1.02 $\pm$ 0.33 ^c	15	0	0	1.6

注:标不同字母表示经过 Duncan's 新复极差检验,具显著差异($P < 0.05$)。后同。

Different superscripts indicate significantly different between groups($P < 0.05$, Duncan's multiple range test). The same below.

A: Treated with + CPE - containing W/O/W emulsion; B: Treated with normal HCG & CPE solution; C: Control treated with Ringer's solution.

2.2 脑垂体、血清 GtH 含量变化

表 2 所示的是注射激素后鳊鲢血清 GtH 含量的动态变化。注射生理盐水的对照组, 血清 GtH 含量变化幅度很小, 在 2~4 ng/ml 之间变动, 极显著低于 A 与 B 组 ($P < 0.01$)。第 11 次注射后 7 d, A 组比 B 组血清 GtH 含量高, 说明注射乳剂比常规注射更能提高血清 GtH 含量。

鳊鲢在激素处理后 90 d, A、B、C 3 组的脑垂体 GtH 含量(质量比)分别为: $(3\ 524.6 \pm 724.8)$ ng/mg ($n = 20$), $(3\ 027.2 \pm 645.7)$ ng/mg ($n = 20$) 和 (683.3 ± 185.5) ng/mg ($n = 10$)。A 组与 B 组脑垂体 GtH 含量均极显著高于对照组。A 组的平均 GtH 含量高于 B 组。

表 2 注射激素后血清 GtH 含量的动态变化

Table 2 The dynamic variation of serum gonadotropin of female Japanese eel after 12th injection ng/ml

取样时间 Sampling time after injection	处理组 Treatment		
	A	B	C
7 d after 11 th injection	29.54 ± 8.84^b	16.32 ± 3.23^{bc}	3.13 ± 1.17^c
3 h	92.33 ± 27.36^d	408.67 ± 86.25^a	2.85 ± 1.02^i
12 h	171.41 ± 30.75^b	142.3 ± 28.61^c	2.72 ± 0.87^j
24 h	143.84 ± 24.71^c	74.2 ± 18.57^e	3.42 ± 1.26^i
48 h	105.68 ± 23.82^d	53.49 ± 18.73^{de}	2.65 ± 0.74^j
4 d	74.45 ± 15.53^a	29.38 ± 10.26^b	2.88 ± 1.53^j
7 d	34.12 ± 10.77^{ab}	17.87 ± 6.84^{cd}	3.57 ± 1.44^j
10 d	18.37 ± 3.14^{cd}	13.63 ± 3.59^d	2.34 ± 1.38^j

2.3 诱导催产结果

注射催产剂(见 1.3)后, A 组 20 尾鳊鲢中, 有 15 尾排卵, 排卵率为 75%, B 组 20 尾中有 11 尾排卵, 排卵率为 55%。A 组的排卵率高于 B 组。

3 讨论

(1) 外源 GtH 注射到鳊鲢体内后, 可刺激性腺产生类固醇激素, 使血清类固醇激素含量增加, 正反馈于脑区和脑垂体, 使脑、脑垂体的 GnRH 含量增加, 促进内源 GtH 的分泌, 从而促进性腺发育^[8,9]。注射含 HCG 与 CPE 的 W/O/W 乳剂后, A 组平均 GSI 高达 35.18%, 而按传统方法注射的 B 组平均 GSI 为 27.97% (表 1)。催产实验表明, 注射乳剂催熟的鳊鲢排卵率高于按常规方法催熟的鳊鲢。以上说明注射乳剂对培养鳊鲢催熟效果较好。研究还表明, 与常规注射方法比较, 乳剂可较长时间的使鳊鲢血

清 GtH 浓度保持在较高水平。

(2) 按常规方法注射 HCG 和 CPE 后, 血清 GtH 含量迅速上升, 在 3 h 达到高峰, 之后迅速下降, 说明外源激素在鳊鲢体内有较高的代谢清除率, 与外源 GtH 或 GnRH 进入金鱼、虹鳟等鱼类体内的情况相似^[4,10]。Duan 等^[11]报道了外源 GtH 在鳊鲢体内消除较快。由于频繁取血有困难, 不可能完全了解注射乳剂后血清 GtH 含量的动态变化, 但从目前结果来看, 注射乳剂后鳊鲢血清 GtH 含量的变化较常规注射缓和, 血清 GtH 浓度高峰比常规注射晚 9 h。血清 GtH 浓度的下降速度也较常规注射组缓和。日本学者 Sato 等^[5]所用的乳剂也有类似效果。本研究所用乳剂与日本学者所用乳剂比较, 无需明胶的脂化过程, 制备简单; 所用材料为常规试剂, 取材方便。以上说明 W/O/W 乳剂对 GtH 有明显的缓释效果, 可促进鳊鲢性腺更好的发育。乳剂中药物的释放与油的种类、比例、粘度及乳化剂类型、比例、HLB 值等众多因素的关系尚需进一步研究。

(3) 以往的缓释催产剂经常只用一种激素^[12,13]。而 Crim^[14]指出, 将类固醇激素与 LHRH-A 联合应用可取得更好的催熟效果。已有数例成功的例子, 如 Tamaru 等^[15]和 Lee 等^[16]联合应用类固醇激素与 LHRH-A 加快了胭脂鱼、遮目鱼的性腺发育; Garcia 等^[17]联合应用 MT 与 LHRH-A 诱导黑鲈产卵。他们联合应用激素时需分开准备两种激素, 将 LHRH-A 与胆固醇混合, 而将类固醇激素装入硅橡胶管或与硅橡胶混合, 激素制剂准备好后要通过埋植方法给药, 较麻烦。若用 W/O/W 乳剂, LHRH-A、GtH 等水溶性物质可溶入内水相, 而类固醇激素等油性物质可溶入油相, 一次注射即可, 操作方便。

参考文献:

- [1] Yamamoto K, Morioka, T Hiroi O, et al. Artificial maturation of female Japanese eels by injection of salmonid pituitary[J]. Bull Japan Soc Fish. 1974, 40:1-7.
- [2] 王义强, 赵长春, 施正峰, 等. 河鳊人工繁殖的初步研究[J]. 水产学报, 1980, 4(2):147-156.
- [3] Cook A F, Peter R E. The effect of temperature on the clearance of intraperitoneally-injected gonadotropin in the goldfish *Carassius auratus*[J]. Aquaculture, 1980, 19:275-285.
- [4] Crim I W, Sherwood N M, Wilson C E. Sustained hormone release. I Effectiveness of LHRH analogue(LHRHa) administration by either single injection or cholesterol pellet implantation on plasma gonadotropin levels in a bioassay model fish, the juvenile

- rainbow trout[J]. Aquaculture, 1988, 74:87-95.
- [5] Sato N, Kawazoe I, Suzuki, et al. Development of an emulsion prepared with lipophilized gelatin and its application for hormone administration on the Japanese eel *Anguilla japonica* [J]. Fish Physiol Biochem, 1997, 17:171-178.
- [6] 邓岳松. 激素诱导培养日本鳗鲡性腺发育和成熟研究[D]. 广州: 中山大学, 2000.
- [7] Lin Hao-ran, Xie Gang, Zhang Li-hong, et al. Artificial induction of gonadal maturation and ovulation in the Japanese eel (*Anguilla japonica*, TETS.) [J]. Bull Fr Peche Piscic, 1998, 349:163-176.
- [8] Dufour S, Montero M, Le Belle N, et al. Differential distribution and response to experimental sexual maturation of two forms of brain gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the European eel, *Anguilla anguilla* [J]. Fish Physiol Biochem, 1993, 11: 99-106.
- [9] 汪小东, 林浩然, 谢刚. 鳗鱼脑垂体匀浆液和人绒毛膜促性腺激素混合注射对鳗鲡脑区促性腺激素释放激素和血清促性腺激素及性类固醇激素含量的影响[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 123-129.
- [10] Cook A F, Peter R E. The effect of temperature on the clearance of intraperitoneally-injected gonadotropin in the goldfish *Carassius auratus* [J]. Aquaculture, 1980, 19:275-278.
- [11] Duan C, Hiranó T. Plasma kinetics of growth hormone in the Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. Aquaculture, 1991, 95:179-188.
- [12] Crim L W, Sutterlin A M, Evans, et al. Accelerated ovulation by pelleted LHRH analogue treatment of spring-spawning rainbow trout (*Salmo gairdneri*) held at low temperature [J]. Aquaculture, 1983, 35:299-307.
- [13] Mylonas C C, Gissis A, Magnus Y, et al. Hormonal changes in male white bass (*Morone chrysops*) and evaluation of milt after treatment with a sustained-release GnRH-a-delivery system [J]. Aquaculture, 1997, 153:301-313.
- [14] Crim L W. Hormonal manipulation of fish seasonal reproductive cycle [A]. Proc 4th Int Symp Reproductive Physiology of Fish [C]. Norwich: Sheffield, 1991.43-47.
- [15] Tamaru C S, Kelley C D, Lee C S, et al. Effects of chronic LHRH-a + 17-methyltestosterone or LHRH-a + testosterone therapy on oocyte growth in the striped mullet (*Mulugi cephalus*) [J]. Gen Comp Endocrinol, 1989, 76:114-127.
- [16] Lee C S, Tamaru C S, Banno J E, et al. Influence of chronic administration of LH-RH-analogue and/or 17 α -methyltestosterone on maturation in milkfish, *Chanos chanos* [J]. Aquaculture, 1986, 58:87-98.
- [17] Garcia L M B. Advancement of sexual, maturation and spawning of sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch), using pelleted luteinizing hormone-releasing hormone analogue and 17 α -methyltestosterone [J]. Aquaculture, 1990, 86:333-335.

Induction of gonadal development and maturation in *Anguilla japonica* by injection of HCG & CPE – containing W/O/W emulsion

DENG Yue-song¹, LIN Hao-ran², XIE Jun³, PAN De-bo³, WANG Guang-jun³, XU Zi-rong¹

(1. Feed Science Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. College of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China; 3. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: Female cultivated eel (*Anguilla japonica*), body weight 330~680 g, body length 62~67 cm, were employed without being fed during the experiment with water temperature 14~25℃, salinity 30~34 and natural light intensity. In the gonadal maturation induction test, by injecting the W/O/W (water-oil-water) multiple emulsion 12 times at 7 d intervals, containing HCG & CPE (carp pituitary extraction), the average GSI of the eel increased to 35.1% with the highest 56.5%. While the average GSI in the groups injected with routine HCG & CPE is 27.9% with the highest 50.4%, lower than that in the W/O/W groups. In the ovulation induction test the female eel were induced by injecting the W/O/W multiple emulsion (containing LHRH-A, HCG and CPE) and DOM. The ovulating rate of the eel in W/O/W groups was more than those in routine HCG & CPE groups. The serum GtH levels in W/O/W groups remained significantly higher than those in routine groups.

Key words: W/O/W multiple emulsion; *Anguilla japonica*; gonad development; maturation induction; spawning induction