

野生石鲈精巢发育及注射 LHRH-A 对血浆 T 水平的影响研究

高 玲, 温海深, 马学坤, 王连顺

(中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003)

摘要:采用常规石蜡切片, 组织染色法和放射免疫测定方法(RIA)对石鲈(*Kareius bicoloratus*)精巢的发育状况和生殖季节血浆睾酮(T)对注射外源促黄体激素释放激素类似物(LHRH-A)的反应进行研究。结果表明, 石鲈精巢为小叶型, 精巢发育分为6个时期。性腺成熟系数(GSI), 肝重指数(HSI)和肥满度(CF)呈现显著的季节变化。注射 LHRH-A 后6 h, T 含量显著上升, 之后的12 h, 24 h 逐渐下降, 48 h 又显著回升, 几乎达到注射前的8倍; 对照组血浆 T 含量在注射后6 h 显著下降, 12 h 变化不大; 24 h 又显著回升, 48 h 继续回升, 但低于处理组。[中国水产科学, 2006, 13(5): 845-850]

关键词:石鲈; 精巢; 睾酮; LHRH-A

中图分类号: S945.4; Q955.486 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)05-0845-06

鱼类性腺既是产生配子的场所, 也是重要的内分泌器官。在鱼类性腺发育成熟和排放过程中, 性类固醇激素通过负反馈作用来协调脑垂体促性腺激素(GnH)适量的合成与释放, 以促进正常的性腺发育和排放, 在更高层次上它可能参与整合下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴各因子的协调作用^[1-2]。但是, 性腺发育特征、性激素分泌节律以及它们与生殖周期的关系, 在鱼类种间存在较大差异。

几年来, 国内外有关海水养殖鱼类雄性个体繁殖生物学研究日益增多^[3-9], 这些成果为进一步研究海水鱼类内分泌生理学奠定了必要基础。

石鲈(*Kareius bicoloratus*)属于鲈形目(Pleuronectiformes), 鲈科(Pleuronectidae), 石鲈属(*Kareius*), 分布于中国的黄海、渤海的近海水域, 也见于日本和韩国海域。有关野生石鲈繁殖生物学和驯养技术研究有一些报道^[10-13]。但关于石鲈精巢发育和血浆雄激素分泌研究尚未见报道。本实验以黄海野生石鲈为对象, 研究精巢发育的周期变动以及血浆 T 对注射 LHRH-A 的反应性, 旨在丰富硬骨鱼类繁殖生理学内容, 并为完善石鲈的人工繁殖技术提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验鱼来源与处理

分别于2004年4~6月(6尾)、7~9月(5尾)、10~12月(12尾)、2005年1~3月(5尾)在台南山水产品市场购买石鲈雄鱼(性腺组织学和腹部大小确定雌雄), 体长12.5~33.5 cm, 体质量33.9~646.8 g, 年龄为1~3龄(通过椎骨年轮判断)。在实验室水族箱中暂养2~3天, 流水充氧, 满足自然光照, 水温维持在13~17℃。性成熟鱼(体长23.6~33.5 cm, $n=10$)分为2个实验组, 第一组($n=5$)注射 LHRH-A(剂量为30 $\mu\text{g}/\text{kg}$); 第二组($n=5$)注射等剂量的生理盐水(PS), 为对照组。促黄体激素释放激素类似物[DAI⁶, Pro⁹ Net]-luteinizing hormone-releasing hormone(LHRH-A), 购自浙江宁波市激素制品有限公司。

1.2 样品采集

实验前测量所有鱼的生物学指标并解剖取其性腺, 计算性腺成熟系数($\text{GSI} = [\text{性腺重}/(\text{体质量} - \text{内脏重})] \times 100$), 肝重指数($\text{HSI} = [\text{肝脏重}/(\text{体质量} - \text{内脏重})] \times 100$), 肥满度($\text{CF} = (\text{体质量}/\text{体长立方}) \times 100$)。注射前(0 h), 注射后6 h, 12 h, 24 h, 48 h 尾静脉取血, 每尾鱼每次1 mL。采取的血液样品在4℃下静置4~6 h 后离心6~7 min(16 000 r/

收稿日期: 2005-10-27; 修订日期: 2006-01-05。

基金项目: 农业部海洋水产增养殖学与生物技术重点开放实验室开放课题项目(K2003-02)。

作者简介: 高 玲(1976-), 女, 硕士研究生, 从事鱼类生理学研究。E-mail: gaoling2010@126.com

通讯作者: 温海深。E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn

min)制成血清,放置 -40°C 低温冰箱中储存,待测激素。

1.3 实验方法

常规 HE 染色,中性树胶封片,Nikon E200 型光学显微镜观察及显微摄影,参考鲤科鱼类分期标准对性腺进行分期。采用放射免疫测定方法(RIA)进行血清 T 含量测定,T 放射免疫测定试剂盒购自天津九鼎医学生物工程有限公司,并根据鱼类特性进行改进。 γ 免疫计数器(SN695B6)购于上海日环光电有限公司。

1.4 数据分析

实验所得数据均表示为平均数 $\pm$ 标准差($\bar{X} \pm \text{SE}$),采用 SPSS 软件统计包中的 Duncan's 法进行数据处理和检验分析,当 $P < 0.05$ 时差异显著。

2 结果

2.1 GSI, HSI, CF 的季节变化

雄性石鲮的 GSI 在 10~12 月份出现 1 个峰值,平均为 1.976 6 ($n=12$);之后开始下降,第二年的 1~3 月份均值降到 0.883 5 ($n=5$);4~6 月继续下降,平均为 0.066 0 ($n=6$),7~9 月 GSI 有所回升,平均达 0.656 2 ($n=5$)。HSI 在 4~6 月最高,均值 2.018 5 ($n=6$);7~12 月持续下降,从 1.685 7 ($n=5$)下降到 1.518 5 ($n=12$);1~3 月回升到均值为 1.542 3 ($n=5$)。CF 在 7~9 月最高,均值 2.143 9 ($n=5$),10 月至第二年的 3 月呈下降趋势,由 10~12 月份的 1.702 9 ($n=12$)降到 1~3 月份的 1.597 1 ($n=5$),之后的 4~6 月份均值增加到 2.038 1 ($n=6$)详见图 1。

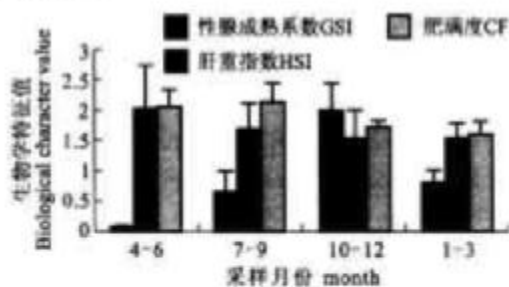


图1 石鲮雄鱼 GSI, HSI 和 CF 的季节变化

Fig.1 The seasonal change in the GSI, HSI and CF of male *Karuss bicoloratus*

2.2 精巢的分期和发育状况(图版 I)

2.2.1 精原细胞期(I期)

呈透明的细线状,浅灰色,此期精巢边缘有微缺刻,卵巢边缘光滑(图版 I-1)。腹膜和肠系膜及腹壁紧密相连。此期平均成熟系数 0.032。切片显示精巢精小叶不清楚,精巢中散在着很多单个精原细胞,胞质嗜碱性较强,着色深,胞径 5.11~7.23 μm 。胞核很大,核径为 3.59~4.78 μm ,但核质少,核质几乎不着色或着色很浅,中央大多有 1 个被苏木精染成深紫色的大核(图版 I-3)。精原细胞发育到后期往往三五成群,周围由滤泡细胞包裹开始形成较小的精小叶。I 期精巢一生只出现 1 次。

2.2.2 精原细胞增殖期(II期) 精巢细长带状,边缘波浪形,灰白色,半透明(图版 I-2)。此期平均成熟系数 0.075。此期精巢分为繁殖后再待成熟个体和初次进入生殖周期的个体。后者切片观察,生精小管形成,生殖细胞增多,精原细胞较上期小,胞径 3.49~5.07 μm ,核径 2.87~3.62 μm 。精小叶蜂窝状界限明显,生殖细胞在精小叶内开始定向成束排列,形成实心的精细小管,胞核明显,大核仁 1 个,染色仍很深(图版 I-3)。

2.2.3 精母细胞生长、成熟期(III期) 扁薄片状,边缘波浪状,灰白色,透明度降低(图版 I-4),平均成熟系数 0.611。生殖细胞数量进一步增加,III 期早期生殖细胞正经历由精原细胞到精母细胞的分裂活跃阶段,初级精母细胞个体体积变小,胞径 1.35~3.55 μm ,核径 1.91~2.98 μm ,核质比增大,胞质着色更浅或不着色,胞核染色加深(图版 I-5)。III 期晚期由初级精母细胞经历第一次成熟分裂所形成的次级精母细胞体积更小,嗜碱性增强,核染色极深。此时的 III 期精巢表现出非同步性,精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞同时存在。有的还发育到精子细胞阶段。只是 III 期精巢存在时间很短,次级精母细胞很快进行第二次成熟分裂而产生 2 个精子细胞进入下一期状态。

2.2.4 精子细胞变态期(IV期) 呈乳白色的精巢相当发达,表面血管清晰(图版 I-6)。IV 期精巢的发育同步性很高,特别是晚期。精子细胞和正在形成的精子充满每个精小囊(图版 I-7),有些已经发育成成熟精子,轻压腹部有少量精液流出。精子细胞圆形小粒状,体积在所有精细胞中最小,直径 1.32~2.35 μm ,细胞核大、染色极深,整个精巢看到的是染成深蓝色的精细胞胞核,而看不到明显的细胞质(图 I-7、8)。而此期的生精小管开始退化消失。IV 期平均成熟系数 1.064。

2.2.5 精子细胞成熟期(V期) 膨大的精巢软体状,乳白色,表面血管更加清楚(图版 I-8),平均成熟系数达 2.112。此期细胞数量达到顶峰,切片观察整个精巢内充满成熟精子,精小囊消失或融合相通。精子是精子细胞经过一系列的形态变化发育成熟的,直径为 $0.99 \sim 1.53 \mu\text{m}$ 。精子密集处形成漩涡流动状态,被染成浅红色的尾巴可形成流线型,而被染成深蓝色的圆形核即为精子头部(图版 I-9)。此期轻按鱼体腹部大量乳白色精液从泄殖孔流出。

2.2.6 退化吸收期(VI期) 排完精子的精巢松弛,体积缩小,略带黄色(图版 I-10),平均成熟系数 0.351。切片显示精囊萎缩状,精子排出留下许多囊腔,有的囊腔内残留一些未排出的精子,有些空腔内只剩下一些 Sertoli 细胞(图版 I-11),这些 Sertoli 细胞往往三五成群,胞体很大,胞质不着色,中央有 1 个被染成蓝色的大核仁。

2.3 注射外源激素 LHRH-A 对生殖季节石鲮血清 T 含量变化的影响

雄鱼在注射 LHRH-A 后 48 h 内 T 的变化情况如图 2。与注射前相比,注射后 6 h 血浆 T 水平显著升高(平均 35.36 ng/mL , $P < 0.05$);12 h,24 h 略有下降,48 h 又显著回升($P < 0.05$),幅度为注射前的 8 倍,达到均值 71.83 ng/mL 。对照组 T 的变化趋势和注射组不同,注射后 6 h 和 12 h 血浆 T 水平显著降低($P < 0.05$),均值为 4.79 ng/mL ,注射后 24 h 和 48 h,血浆 T 水平显著升高,远远高于注射前水平(图 2)。

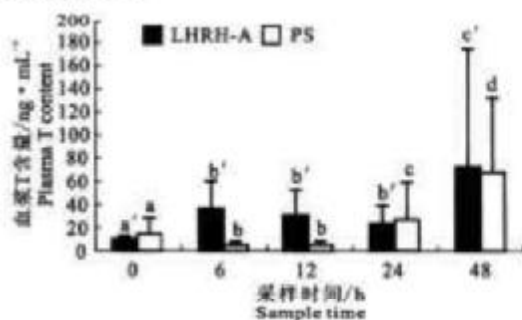


图2 注射 LHRH-A 和生理盐水(对照组)后血浆 T 水平变动

注:图中标有相同字母的表示差异不显著。

Fig.2 Plasma testosterone level in male fish post-injection with LHRH-A and PS

Note: T levels are identified by the same superscripts.

3 讨论

根据精巢内生殖细胞的分布和发育特点,一般将硬骨鱼类的精巢结构分为两种类型:小叶型(lobular type)和小管型(tubular type)^[14]。大多数硬骨鱼类的精巢为小叶型,石鲮精巢属于叶型结构,其特点为初级精原细胞在精小叶的所有部位都可存在;而小管型精巢的初级精原细胞只在小管的盲端分布。

石鲮精巢的发育与其他硬骨鱼类相似,生殖细胞经历了精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞和精子 5 个典型发育阶段。而且精细胞在发育过程中出现非同步现象。林鼎等^[15]在研究鳗鲡(*Anguilla japonica*)性腺发育组织学和细胞学时发现,精细胞的发育存在同步-非同步-同步的“追赶”现象。石鲮精细胞的发育和鳗鲡相似,也存在“追赶”现象。I 期和 II 期的精巢都是精原细胞,同步性很好。III 期精巢中精原细胞、精母细胞和精子细胞同时存在,甚至还能看到少量精子,精细胞发育的非同步性非常明显。但到了 IV 期晚,这种非同步性消失,精细胞的发育表现出高度一致,为石鲮分批同步型排精提供保证。

从石鲮 GSI 的季节变化可以看出,GSI 只在 10~12 月份出现一次高峰,这与组织学染色发现处于此期的石鲮精巢大多处于 IV⁺ 期或 V 期的结果是吻合的,也为石鲮是同步排精方式提供了佐证。HSI 和 CF 的变化都和性腺的发育紧密联系,GSI 在峰值出现前增加迅速,HSI 相对下降,这与朱玲等^[16]在野生鲢性腺发育及其与肝重指数关系的研究中指出雄鱼性腺开始成熟时 HSI 缩小,进入繁殖期后 HSI 进一步缩小的现象相一致,这可能是由于雄鱼不像雌鱼那样存在卵黄蛋白原的合成和转移。CF 在早期增长较快说明早期鱼类以长体为主,后期进入以性腺发育为主阶段而使 CF 相对下降。

本实验采用一次性注射,处理后 6 h,血浆 T 含量显著升高($P < 0.05$),这和堂啸尘等^[17]对花尾胡鲈(*Plectorhynchus cinclus*)的研究一致。说明 LHRH-A 能有效促进性类固醇激素的产生和释放,但是 T 水平远没有达到石鲮排精的“阈值”。尽管 2 组鱼都有部分排精,而且有 1 尾鱼处于顺产后状态,但出现在对照组而不是处理组,可以排除不是 LHRH-A 的生理效应,而与实验鱼的发育状态有关。说明注射 LHRH-A 能显著提高血浆 T 含量但

并没有增加石鲮的精液体积,可能是由于精液体积的增加与T含量不相关^[18]。原因可能是一次性注射的外源激素6 h左右在血液内很快被清除完毕,要想维持这种较好的催产效果,就加大注射剂量或增加注射次数,目前生产单位常常采用这种方法;但是长期大剂量或多次注射外源激素对石鲮鱼的正常生理活动会产生不良影响。12 h、24 h持续平稳下降;48 h突然大幅回升且高于注射前近8倍,这似乎说明:血浆中过量的GtH水平对精巢T分泌起到了某种抑制作用,当这些外源激素在体内被代谢完毕,血浆T水平又恢复到较高水平,但有关作用机理并不十分清楚。对照组6 h、12 h血浆T含量显著下降,原因可能是实验鱼在实验过程中操作产生的胁迫作用,血浆皮质醇含量的升高抑制了下丘脑-垂体-性腺轴的正常功能,致使血浆T含量降低^[19],这种胁迫作用随着时间的延长逐渐减弱,就出现24 h、48 h显著回升的现象。

因此,在对石鲮进行人工繁殖时,建议采用缓释激素埋植系统,这在其他比目鱼中得到较好应用。例如雄性木叶鲮(*Platichthys stellatus*)在生殖期埋植不同剂量的LHRH-A能显著提高生殖初期血浆T水平,精液的体积和数量均明显增加,并且与LHRH-A呈现显著的剂量依存关系;给庸鲮(*Hippoglossus hippoglossus*)雄鱼埋植LHRH-A可以显著提高血浆孕酮水平,精液量明显升高^[20];在生殖期对性成熟的雄性黄尾黄盖鲮(*Pleuronectes ferrugineus*)进行LHRH-A埋植,精液产量显著提高,血浆T维持较高水平^[21]。

参考文献:

- [1] 林浩然.硬骨鱼类促性腺激素分泌及其调节机制[J].水生生物学报,1982,7(4):551-562.
- [2] Schoonen W G E J, Granne man J C M, Lambert J G D, et al. Steroid genesis in the testes and seminal vesicles of spawning and non spawning African catfish, *Clarias gariepinus* [J]. Aquaculture, 1987, 63: 77-88.
- [3] 林丹军, 张健.人工养殖的大黄鱼性腺发育及性周期研究[J].福建师范大学学报(自然科学版), 1992, 8(3): 81-87.
- [4] 洪万树, 翁幼竹, 林君卓, 等.鲷鱼精子发生和形成的超微结构研究[J].海洋学报, 2001, 23(5): 116-120.
- [5] 林君卓, 翁幼竹, 方永强, 等.鲷鱼精子发生的组织学研究[J].台湾海峡, 2001, 20(1): 57-60.
- [6] 张永忠, 徐永江, 柳学舟, 等.圆斑星鲷精子的超微结构及核前区特殊结构[J].动物学报, 2004, 50(4): 630-637.
- [7] Lone K P, AL-Ablani, S, A L-Yaqout A. Steroid hormone profiles and correlative gonadal histological changes during natural sex reversal of sobaity kept in tanks and sea-cages[J]. J Fish Biol, 2001, 58, 305-324.
- [8] Rahman M S, Takemura A, Takano K. Lunar synchronisation of testicular development and plasma steroid hormone profiles in the golden rabbitfish[J]. J Fish Biol, 2000, 57, 1065-1074.
- [9] Loir M, Le Gac F, Somarakis S, et al. Sexuality and gonadal cycle of the common dentex *Dentex dentex* in intensive culture[J]. Aquaculture, 2001, 194: 363-381.
- [10] Omori M, Kinno H, Nishihata I. Study of the habitus of juvenile stone flounder, *Kareius bicoloratus* (Basilwsky), in the estuary of the Nanakita River, Tohoku[J]. J Agric Res, 1976, 27(2): 79-91.
- [11] Park J S. Maturity and spawning season of the stone flounder *Kareius bicoloratus* in approaches to Kyonggyobiyo of Yellow Sea Korea[J]. Fish Sci Res, 1995, 11: 51-57.
- [12] Uehara S, Shimizu M. Maturity, condition and feeding of stone flounder *Kareius bicoloratus* in Tokyo Bay[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1999, 65(2): 209-215.
- [13] Wang L C, Liu Z H, Wang Y Y, et al. A study on technique for artificial fry-rearing of stone flounder (*Kareius bicoloratus*) [J]. Oceanogr Huanghai Bohai Sem, 2001, 19(1): 55-59.
- [14] Billard R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species[J]. Reprod Nutr Develop, 1986, 26(4): 877-920.
- [15] 林浩然. 鲷鱼繁殖生物学研究. 鲷鱼性腺发育组织学和细胞学研究[J]. 水生生物学集刊, 1984, 8(2): 157-170.
- [16] 朱玲, 温海深, 毛玉萍. 野生鲷性腺发育及其与肝重指数关系的研究[J]. 水利渔业, 2002, 22(5): 26-27.
- [17] 董晓生, 刘楚吾. 外源激素对花尾胡椒鲷血清性类固醇激素的影响[J]. 海洋学报, 2003, 27(5): 5-6.
- [18] Moon S H, Lim H K, Kwon J Y, et al. Increased plasma 17-hydroxyprogesterone and milk production in response to gonadotropin releasing hormone agonist in captive male starry flounder, *Platichthys stellatus* [J]. Aquaculture, 2003, 218: 703-716.
- [19] 温海深, 宋海霞, 杨立廷, 等. 外源激素对养殖牙鲆血浆孕酮和雌二醇含量的影响研究[J]. 海洋学报, 2005, 28(4): 115-120.
- [20] Vermeirssen E L M, Shields R, Mauco de Queiro C, et al. Gonadotropin-releasing hormone agonist raises plasma concentrations of progestogens and enhances milk fluidity in male Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* [J]. Fish Physiol Biochem, 2000, 22: 77-87.
- [21] Clearwater S J, Crim L W. Gonadotropin releasing hormone analogue treatment increases sperm motility, seminal plasma pH and sperm production in yellow tail flounder *Pleuronectes ferrugineus* [J]. Fish Physiol Biochem, 1998, 19: 349-357.

Development of testis and the response of plasma testosterone to injection with LHRH-A in wild male stone flounder (*Kareius bicoloratus*)

GAO Ling, WEN Hai-shen, MA Xue-kun, WANG Lian-shun

(Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The development of testis and the response of plasma testosterone in reproductive season to injection with extrinsic LHRH-A of wild male stone flounder are studied by the methods of paraffin slice, histological staining techniques and radioimmunoassay (RIA). The results show that the spermary of stone flounder is lobular type and the testis development can be divided into six stages; GSI, HSI and CF present remarkable seasonal change in a whole reproductive periods; The plasma T levels increase significantly 6 hour post-injection, but decrease gradually post-injection 12 h, 24 h and the lowest level occurs at 24 h; which increases significantly again post-injection 48 h, and almost is eight times than that at 0 h. Be different from the treated group, the plasma T level of the control group decrease significantly at 6 h, and is almost unchanged to 12 h, increases remarkably post-injection 24 h and this phenomenon persists to 48 h, but the plasma T level of the control group is lower than the treated group. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(5): 845 - 850]

Key words: stone flounders; testes; testosterone; LHRH-A

图版 I 说明

1: I 期精巢, 比例尺示 100 μm ; 2: II 期精巢, 比例尺示 70 μm ; 3: 图版 I - 2 的放大, 箭头示一完整的精小囊, 内为精原细胞, 比例尺示 24 μm ; 4: III 期精巢, 比例尺示 70 μm ; 5: 图版 I - 4 的放大, 示精原细胞, 精母细胞和精子细胞, 比例尺示 24 μm ; 6: IV 期精巢, 示比例尺 70 μm ; 7: 图版 I - 6 的放大, 示一个完整的精小叶, 比例尺示 24 μm ; 8: V 期精巢, 比例尺示 70 μm ; 9: 图版 I - 8 的放大, 示成熟的精子尾巴呈流线型, 比例尺示 24 μm ; 10: VI 期精巢, 比例尺示 70 μm ; 11: 图版 I - 10 的放大, 示精子排出后留下的空腔, 腔内有少量精子(箭头)和成团的支持细胞, 比例尺示 24 μm .

(Sg, 精原细胞; SP, 精母细胞; SPTD, 精子细胞; Ss, 精子; LC, 小叶腔; SC, 支持细胞; ST, 精小囊)

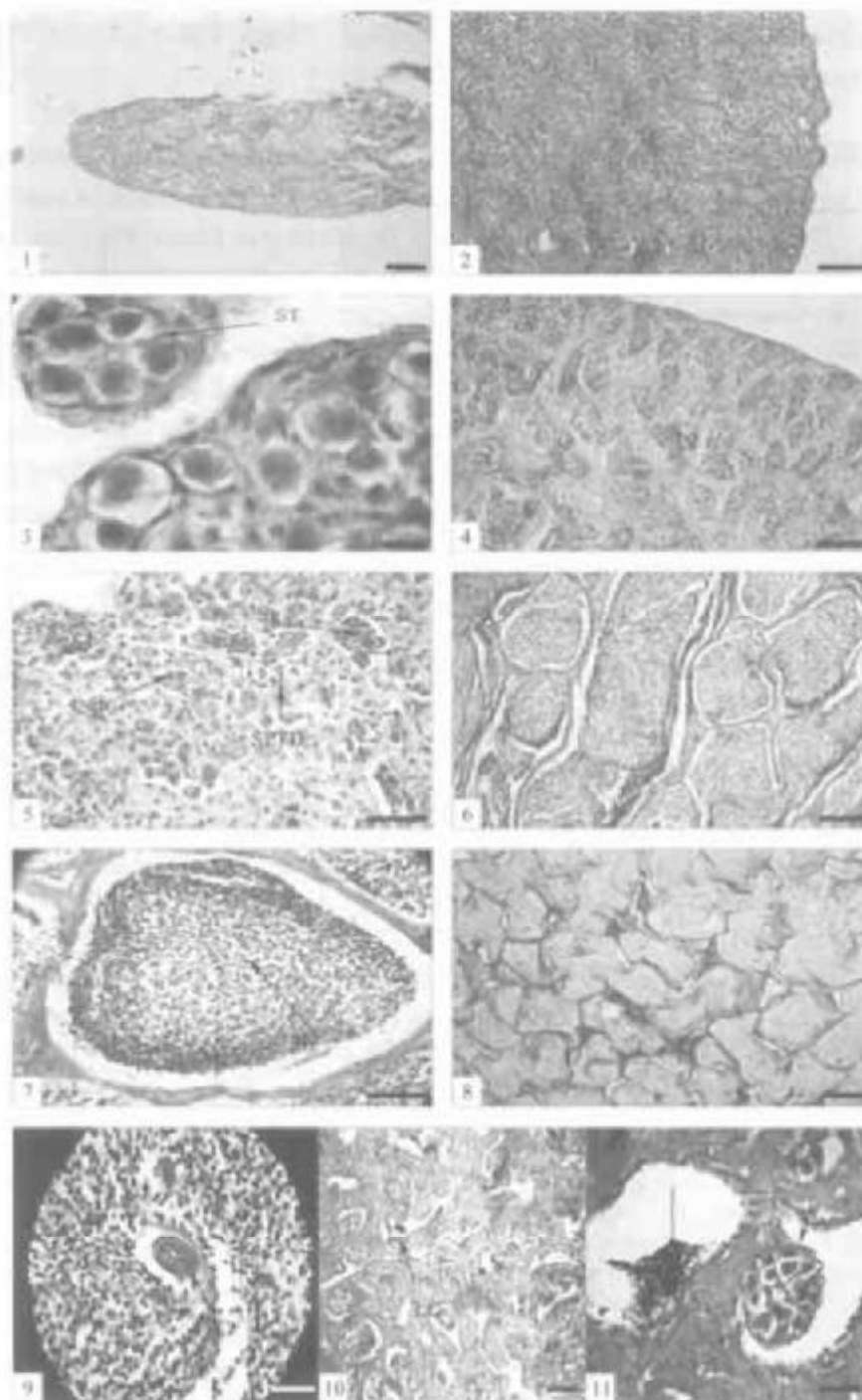
Explanation of Plate I

1: The testis in the stage I, bar = 100 μm ; 2: The testis in the stage II, bar = 70 μm ; 3: The magnification of picture 2 shows a intact seminiferous theca and spermatogonia, bar = 24 μm ; 4: The testis in the stage III, bar = 70 μm ; 5: The magnification of picture 4 shows spermatogonia, spermatocytes and spermatid, bar = 24 μm ; 6: The testis in the stage IV, bar = 70 μm ; 7: The magnification of picture 6 shows a intact seminal lobule, bar = 24 μm ; 8: The testis in the stage V, bar = 70 μm ; 9: The magnification of picture 8 shows the streamline tail of mature spermatozoa, bar = 24 μm ; 10: The testis in the stage VI, bar = 70 μm ; 11: The magnification of picture 10 shows a few spermatozoa and sertoli cell in the cavums after ejection of spermatozoa, bar = 24 μm .

(Sg, spermatogonia; SP, spermatocyte; SPTD, spermatid; Ss, spermatozoa; LC, lobule cavums; SC, sertoli cell; ST, seminiferous theca)

高 玲等:野生石鲈精巢发育及注射 LHRH-A 对血浆 T 水平的影响研究

GAO Ling et al: Development of testis and the response of plasma testosterone to injection with LHRH-A in wild male stone flounder (*Kareius bicoloratus*)



图版 I 石鲈精巢发育的年周期变化

Plate I The development and annual change in the testis of *Kareius bicoloratus*

(图版 I 说明见第 849 页 Explanation of Plate I at page 849)