

激素缓释制剂诱导海水养殖鱼类性腺发育成熟 与生殖行为的研究进展

温海深, 林浩然

(中山大学水生经济动物研究所, 广东 广州 510275)

摘要:综述促性腺素释放激素类似物(GnRH-a)缓释制剂(SRDS)、人绒毛膜促性腺激素(HCG) SRDS、类固醇激素 SRDS、雄烯二酮(ADSD)和 17 α -甲基睾丸酮(MT)以及鲑垂体匀浆(CPE)混合 SRDS 诱导海水养殖鱼类性腺发育成熟和生殖行为的效果。认为采用 GnRH-a SRDS 处理性腺发育良好的鲈形目鱼类和鲟鳇鱼类, 可以显著提高血液促性腺激素(GtH)水平, 且持续时间长, 诱导排卵成功; HCG 乳胶 SRDS 可诱导日本鳗鲡(*Anguila japonicus*)血液 GtH 持续升高, 性成熟系数明显升高并且性腺发育成熟; HCG 和 CPE 水/油/水(W/O/W)复乳 SRDS 对日本鳗鲡的催熟效果显著, 采用 ADSD 和 MT SRDS 可成功诱导日本鳗鲡性腺成熟与排卵。

关键词:缓释制剂; 性腺; 成熟; 驯养

中图分类号: S961.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737(2002)02-0177-06

给予激素缓释制剂(sustained-release delivery systems, SRDS)是诱导因驯养而导致性腺发育不良鱼类性成熟和生殖的方法之一。近年来, 随着海水养殖业的迅速发展, 这种方法的应用范围不断扩展, 给药途径多样化(埋植和注射)、激素单一或混合使用, 操作简便、激素作用持续时间长、对不易驯化的海水鱼类诱导生殖效果好。本文就近年来国内外在该领域的研究进展, 在促性腺素释放激素类似物(GnRH-a)缓释制剂、促性腺激素(GtH)缓释制剂、类固醇激素缓释制剂、雄烯二酮(ADSD)和 17 α -甲基睾丸酮(MT)以及混合激素制剂诱导海水养殖鱼类性腺发育成熟和生殖过程的效果作一综述, 以期对海水鱼类的人工繁殖和苗种培育提供参考。

1 GnRH-a SRDS 诱导海水鱼类生殖

早在 20 世纪 50 年代, 人们就发现连续注射脑垂体匀浆能够提高鱼类的催产效果, 但是多次处理会产生许多不利影

响, 如激素重复处理需要大量的人力、物力, 操作麻烦; 重复处理会对鱼类产生胁迫(stress)作用, 易导致产卵死亡, 至少影响卵母细胞达到最后成熟(final oocyte maturation, FOM)。用激素处理后的条纹狼鲈(*Morone saxatilis*)很难预测准确的排卵时间, 挖卵检查显示, 过早或过晚的人工挤卵会降低卵的质量^[1]。大量研究表明, 与天然大马哈鱼促性腺素释放激素(sGnRH)相比, 注射 GnRH-a 能更好地抵抗血液中酶的降解, 从而延长 GtH 的释放时间^[2-6]。由于 GnRH-a 在血液中的存留时间不长, 诱导的 GtH 峰值维持时间较短^[4, 7-10], 因此 1 次注射难以诱导鱼类 FOM 与排卵和产卵。在已研究的鱼类中, 绝大多数采用 2 次注射 GnRH-a 才能诱导排卵。如大眼梭鲈(*Stizostedion vitreum*)、黄鲈(*Perca flavescens*)^[11]、舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[12]、亚洲尖吻鲈(*Lates calcarifer*)^[13]和大多数鲑鱼^[14-15]。而有些种类, 即使是 2 次注射也不会诱导排卵。如条纹狼鲈在驯养条件下只能完成卵黄沉积, 却达不到 FOM; 2 次注射使血液中 GnRH-a 含量提高(维持约 7 d), GtH、雌二醇(E₂)和睾酮(T)也随之升高, 当 GnRH-a 被清除, 血液中的 GtH、E₂ 和 T 下降到处理前的水平。17 α , 20 β -21 三羟孕酮(20 β -S)是条纹狼鲈卵母细胞成熟诱导的类固醇^[16], 它在 2 次注射 GnRH-a 后并没有显著升高, 卵母细胞的成熟度没有明显进展。因此, 只有使用缓慢释放激素制剂才能诱导条纹狼鲈 FOM 与排卵和产卵。

1.1 GnRH-a SRDS 的类型

收稿日期: 2001-12-11.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970586); 广东省自然科学基金资助(980308)。

作者简介:温海深(1963-), 男, 博士, 副教授, 主要从事鱼类生殖生理学研究, 现在青岛海洋大学水产学院博士后工作站工作。

E-mail: whs106@163.net

通讯作者:林浩然。

(1) 采用胆固醇和纤维素为制备基质, 可以调节激素释放的速度^[17, 18], 快速 GnRH-a SRDS 可以诱导血液中 GtH 的峰值维持 8 d, 慢速 SRDS 激素释放至少可以维持 8 周。这种 SRDS 可以制成固形柱状体丸剂(直径 3 mm), 使用专门的器具进行肌肉埋植。它制作简单、价格低廉, 但 GnRH-a 释放量在个体间存在较大差异^[17, 18]。

(2) GnRH-a SRDS 做成直径为 5~200 μm 的微球, 其基质成份是可被生物降解的乳酸和乙醇酸的聚合物(LGA)。微球采用双层乳胶包埋。使用时, 将微球溶解在粘性载体溶液中, 用注射器进行肌肉注射。微球中的 GnRH-a 缓慢释放并能持续几个月, 其效果主要取决于乳酸和乙醇酸的比例(即聚合物的比重)。在鱼类中应用的 LGA 制剂基质^[2, 7, 19, 20]大多数都是在人类或家畜中使用的。鉴于鱼类的体温较低, 专门研制了鱼型 LGA SRDS, 并已成功用于金头鲷(*Sparus auratus*)、太平洋鲑和大西洋鲑等^[4, 21, 22]。另一种可被生物降解的微球基质是多酸酐聚合物, 主要是脂肪酸二聚体和癸二酸(Fad-sa)。这种微球也采用乳胶包埋, GnRH-a 可持续释放至少 8 周^[23]。其最大优点是相同的制剂可用于不同规格鱼类, 根据载体的体积与鱼体重进行调整; 另外, 微球降解的单体成分都是天然产物(乳酸、乙醇酸和癸二酸), 当被亲鱼吸收后不会对人类构成威胁。

(3) 以非降解聚合物为基质制成 GnRH-a SRDS, 多采用乙烯和乙烯基乙酸(EVAc)聚合而成。这种 SRDS 的激素释放速度是通过改变聚合物比重、基质的量、基质的亲水性和疏水性、形状以及是否包衣等进行调节^[24]。EVAc SRDS 持续释放时间为 2~5 周^[22, 25, 26]。通常这种制剂的形状为直径 2 mm 的片状物, 肌肉埋植。与生物可降解微球和胆固醇基质丸剂不同的是, EVAc 片剂储藏期长, 在干燥条件下可放置 3 年(20 $^{\circ}\text{C}$)。

1.2 GnRH-a SRDS 诱导雌鱼 FOM、排卵和产卵

采用 GnRH-a SRDS 处理卵巢发育良好的雌鱼, 可以显著提高血液 GtH 水平, 并导致排卵^[7, 9, 22, 25]。GtH 对 GnRH-a SRDS 的反应类型在种间存在较大差异, 如条纹狼鲈^[26]和金眼狼鲈^[27], 即使血液中的 GnRH-a 始终维持在较高水平(10~14 d), 而 GtH 含量慢慢升高, 在排卵前出现峰值, 这个结果与产卵期间的野生条纹狼鲈情况相似^[28]。这可能是由于脑垂体对 GnRH 刺激的敏感性存在差异, 而能根据性腺不同发育期调节适当的 GtH 分泌量。另一种情况是: 采用 GnRH-a SRDS 能迅速提高血液 GtH 水平, 并在 FOM、排卵和产卵过程中始终保持较高含量, 结果显示血液 GtH 水平变动与来自 SRDS 的 GnRH-a 变化相一致^[22, 25]。这种情况也存在于金头鲷中, 它每天都能进行排卵和产卵^[4], 血液中持续升高的 GtH 水平并不是其真实情况, 当不给予外源激素时, GtH 含量会出现波动^[29]。金头鲷在排卵前 8 h 血液 GtH 含量达到最大, 排卵后迅速下降 50%, 无论使用哪种 SRDS 都能诱导其每天 FOM、自发排卵和产卵^[4], 产卵的数量、质量、受精率和孵化率与对照组无显著差异^[20]。GnRH-

a SRDS 可以提前 6 周给药, 80%~100% 的亲鱼在给药 2 周后排卵^[25, 30], 由于 GnRH-a SRDS 能在自然产卵期前诱导排卵发生, 这种方法在太平洋鲑鱼苗种的商业化生产中已经广泛使用, 显著减少了因产前亲鱼死亡而造成卵的损失, 利用 GnRH-a SRDS 诱导鱼类排卵不影响卵的质量、受精率和孵化率^[19, 21, 25, 30, 31]。GnRH-a SRDS 在诱导分批成熟多次产卵的海水鱼类具有广阔的应用前景, 如欧洲狼鲈在生殖期内产卵 3~4 次, 持续 4~6 周, 采用 2 次注射 GnRH-a 方法, 效应期为 12 h^[12], 之后的产卵需要另外注射 GnRH-a。而采用 GnRH-a SRDS (EVAc 或 LGA 类型) 1 次给药就可以诱导 3~4 次排卵^[32]。采用 1 次注射 GnRH-a 只能使 20% 的金头鲷启动正常的每天产卵周期, 当给予 GnRH-a SRDS 时, 80% 的雌鱼能够完成 FOM、排卵和产卵并持续几周^[4, 7, 20]。用同样的方法也能诱导地中海赤鲷(*Pagrus pagrus*) 每日产卵周期, 注射 GnRH-a 可以增加受精卵的产出量(给药后 3 d)。绝大多数卵的产出是在给予 GnRH-a SRDS 3 d 以后, 产卵期持续 31 d。鲆鲽鱼类养殖是刚刚兴起的产业, 亲鱼主要依靠天然捕捞, 采用 GnRH-a SRDS 诱导排卵和产卵也取得了令人满意的效果。如 EVAc Ead-sa SRDS 使人西洋鲽(*Pleuronectes ferrugineus*) 的总产卵量和优质卵数量增加 3 倍^[33]。太平洋牙鲆(*Paralichthys dentatus*) 的亲鱼也来自野生种群, 1 次 GnRH-a SRDS 处理就可以诱导连续 8 次排卵^[34], 而用鲤脑垂体匀浆(CPE)注射 3~5 次/d, 最多排卵 5 次, 而对照组鱼卵巢没有达到 FOM 的迹象。尽管鲽(*P. platessa*) 在驯养条件下可以产卵, 但采用椰子油或异丁醇树脂 GnRH-a SRDS 注射处理可明显提高产卵量, 持续时间为 20 d^[35]。对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) 的研究表明^[36], 采用 GnRH SRDS 处理 1 次可以获得 100% 产卵率, 雌鱼的产卵时间明显提前, 生殖期缩短近一半。对南方鲆(*P. lethostigma*) 的研究也得出了类似结果^[37], 通过给予 GnRH SRDS 成功诱导南方鲆重复产卵。以上结果说明, GnRH SRDS 能有效提高 GtH 水平并维持峰值, 对诱导分批产卵鱼类 FOM 和排卵是有效的。

1.3 GnRH-a SRDS 促进雄性性腺成熟与精子生成和排精

采用 GnRH-a SRDS 处理能明显提高雄鱼的精液产出量, 与注射 GtH 或 GnRH 制品相比有许多优点。

(1) 1 次注射激素诱导精液量快速增加, 而精子数量没有明显增多。但是, 在大多数情况下, 只简单增加精液量效果不一定很好。如在生产杂交条纹狼鲈时, 由于反复人工挤精液与母本受精, 经过一段时间后雄鱼精液量明显减少^[38]。而采用 GnRH-a SRDS 处理, 不仅能显著提高精液产量, 而且精子的密度、活力和受精能力不受影响^[38]。有时, 精子密度太大对养殖鱼类亦不利, 尤其是鲆鲽类。例如, 野生鲽正常精液的精子密度为 60%, 且具有良好的流动性, 在人工驯养时精子密度超过 85%, 且非常粘稠^[39], 由于其难与水混合而不能用于人工授精。相似的情况也见于庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*), 采用 GnRH-a SRDS 处理产生的精液、精子

密度适合进行人工受精,而对照组精液过于粘稠^[40]。

(2)1次注射 GnRH-a 刺激精液产量升高,维持时间短。如点蓝子鱼(*Siganus guttatus*)在注射 GnRH-a 后 24 h 精液产量明显增加,48 h 后恢复到处理前水平;鲤,每日注射 GnRH-a,持续升高的精液产量只能维持 5 d,之后降到处理前水平;美洲拟鲈(*P. americanus*),1次注射 GnRH-a 不能显著增加精液产量,间隔 24 h 的 2 次注射仅能产生少量精液^[40]。以上实验结果说明有必要在鱼类的血液中维持 GnRH-a 水平,以便诱导长期的精液产出。GnRH-a SRDS 诱导鱼类排精研究,最早始于鲑类。胆固醇基质丸剂、EVA 埋植物、LGA 和 Fad-sa 微球都已经成功用于诱导多种鱼类提早精子生成和提高精液产生量,诸如大西洋鲑^[22~23]、鲱(*Salmo trutta*)^[30]、虹鳟(*S. gairdneri*)^[19]、大鳞大马哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)^[41]、银大马哈鱼(*O. kisutch*)^[25,30]和紅大马哈鱼(*O. nerka*)。在鲑科鱼类中也有类似记载,如 1 次注射 GnRH-a 使欧洲狼鲈精液产量增加,仅持续 7 d;采用 2 种类型的 GnRH-a SRDS 诱导精液产量上升,且维持 28~35 d,对精子的密度和活力没有影响^[42]。同样的处理,在条纹狼鲈也获得了较好效果(精液高水平产量持续 14~20 d)^[43,44]。与雌鱼相同,GnRH-a SRDS 促进了血液 GtH 水平的提高,进而生成了 20 β -S 和 11-酮基睾酮,诱导精子成熟和排精^[38,39,43,44]。

2 GnRH SRDS 诱导海水鱼类生殖

尽管 GnRH-a SRDS 对诱导雌鱼 FOM、排卵和产卵以及提高雄鱼精液产量和质量有较好效果,但是对未完成性腺发育的鱼类诱导是无效的。如在性腺发育早期对太平洋鲱鱼(*Clupeaharengus pallasii*)进行激素处理,未发现对性腺发育有任何促进^[17]。相反,在性腺发育晚期进行激素处理可以诱导 FOM 和精子生成。在南方鲷^[37]和太平洋牙鲷(*P. dentatus*)^[34],性腺处于早期或中期时使用 GnRH-a SRDS 诱导 FOM 是无效的,而注射 CPE 可有效地促进卵母细胞生长和 FOM。在几种鱼类中发现 GnRH-a 只能在性腺发育到一定阶段后,才能促进卵黄沉积和精子生成,这可能是由于在性腺发育成熟以前,脑垂体对 GnRH-a 刺激的敏感性较低,GtH 不能合成和释放^[45]。有些鱼类,GnRH-a 与 T 联合处理可以诱导 GtH 合成、释放和性腺成熟^[46],这说明脑垂体必需首先接受性腺类固醇激素的刺激,GnRH-a 才能促进它释放 GtH。所以,对处于性腺发育早期的鱼类来说,GtH 制品可能比 GnRH-a 更有效,对日本鳗鲡(*Anguila japonicus*)的研究已经证明了这一点。用 HCG 或大马哈鱼 GtH(sGtH-II)处理能诱导日本鳗鲡性腺发育完成^[47,48],但必需每周进行处理,并连续几周。这种方法繁杂且易导致鱼类受伤,如采用 SRDS 可以使处理次数减少至 2~3 次。近年来,生产了亲脂明胶(LG)和脂肪醇制成 GtH 乳胶 SRDS^[49,50],LG 乳胶表面被有纯化的 sGtH-II。对日本鳗鲡实验表明:血液中 sGtH 可持续升高 24 h,对照组每周注射 1 次 sGtH-II,结果

LG 激素处理组在 9 周后性成熟系数明显升高并性腺发育成熟^[50],最后采用 GtH 和 17,20-P 诱导排卵成功。另一种 GtH SRDS 是采用可被生物降解的多邻位酯聚合物制成^[51],基质外包被有 HCG 粉末,将这种 GtH SRDS 制作成粘度较大的液体,进行肌肉注射。

将几种激素混合做成复合制剂,也可以起到延长激素作用时间的目的,其中复乳(multiple emulsion)SRDS 对日本鳗鲡的催熟作用显著。Sato 等^[50]采用 16 烷酸酐和明胶为材料直接制成激素复乳 SRDS,对日本鳗鲡进行催熟取得了满意效果。之后,邓岳松等^[52]在此基础上制成了含有 HCG 和 CPE 水/油/水(W/O/W)复乳 SRDS 对塘养雌性日本鳗鲡进行催熟,结果表明,雌鳗鲡 GSI 平均增加 7.9%;用含有促黄体素释放激素类似物(LHRH-A)、HCG 和 CPE 的复乳和 DOM 生理盐水的混合悬剂对达到性成熟的鳗鲡进行催产,排卵率为 75%,显著高于对照组,同时注射复乳制剂的实验组鳗鲡血清 GtH 长期保持高水平,而且其波动比对照组缓和。

3 性类固醇激素缓释制剂诱导鱼类生殖

我国采用类固醇激素 SRDS 成功诱导日本鳗鲡性腺成熟与排精、排卵。Lin^[53]研究表明:8 次埋植 MT 或 ADSR SRDS(剂量为 50 μ g/g 体重,持续 15 d),明显促进雌鳗鲡性腺成熟(GSI 升高 11%);同样方法对雄鳗鲡也有显著的促性腺发育作用(GSI 提高 1.4%)。MT 或 ADSR SRDS 埋植可显著提高脑垂体和血清 GtH 水平,以及雌鱼 E₂ 水平和雄鱼 T 水平,表明性类固醇激素可以在下丘脑-垂体-性腺轴水平上诱导日本鳗鲡性腺发育成熟,并具有正反馈作用。后来的实验进一步证明了这一结果,雄烯二酮 ADSR SRDS 埋植成功诱导雄性日本鳗鲡达到性成熟^[54],7 尾对照组鱼类没有性成熟鱼类,实验组 15 尾亲鱼在 70 d 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。张利红等^[55]对日本鳗鲡埋植 ADSR 和 MT 后的血清 GtH 动态进行了研究,认为 1 次或者多次埋植 ADSR,第 1~5 d,血清 GtH 水平上升,然后开始下降,血清 GtH 水平上升的幅度随着埋植次数的增加而增加。埋植 MT 7 次后,血清 GtH 水平显著升高(低于 ADSR 组),说明 ADSR 促进 GtH 分泌的作用高于 MT。另外 ADSR 能够促进鳗鲡垂体和脑中哺乳类促性腺释放激素(mGnRH)的合成与释放,说明雄激素对性腺未成熟的雌鳗鲡在脑和垂体 2 个水平上存在正反馈作用。

4 鱼类诱导生殖方法的进一步研究和展望

业已证明,驯养鱼类不能达到 FOM、排精、排卵和产卵,是因为脑垂体不能正常分泌和释放 GtH。以前大量的研究都集中在外源 GnRH 对 GtH 释放的影响以及性腺最后成熟的各个环节。在驯养条件下,亲鱼脑垂体受到不利的环境因素影响而导致 GnRH 系统失去正常功能。进一步的研究应

侧重 GnRH 系统在驯养条件下所发生的改变和纠正方法,因此应对养殖鱼类的 GnRH 系统进行更深入研究。目前一致认为绝大多数硬骨鱼类都含有 2 种或更多形式的 GnRH。在金头鲷脑中发现存在 3 种形式的内源 GnRH^[56~58],前 2 种为 sGnRH 和鸡 GnRH(cGnRH-II),第 3 种为鲷所特有(sbGnRH),后来发现其他鲈鱼中也有类似现象。似乎在所有的鲈形目鱼类脑中同时存在 3 种形式的 GnRH,而鲈形目鱼类也是养殖种类和生殖障碍最多的类群。上述 3 种 GnRH 在脑垂体中的定位、GnRH 释放活性和生理学变化以及 mRNA 水平的系统研究结果认为^[4,5],在金头鲷和其他的鲈形目鱼类中, sbGnRH 是主要的 GnRH 释放刺激因子,与 FOM、排卵和产卵密切相关。这说明以前完全忽视了对 sbGnRH 的研究,今后应主要研究驯养对 GnRH 系统的影响以及在此条件下鱼类产生生殖障碍的原因。对高效 GnRH 类似物的研究应注重高效、低价,尤其要深入研究 sbGnRH 和 cGnRH-II 类似物^[4,5]。这 2 种形式的 GnRH 存在于已经完成性腺发育的鱼类脑垂体中,在金头鲷,它的合成峰值在排卵后 8 h^[29], sbGnRH 与 cGnRH-II 类似物联合给予应更有效促进排卵和产卵。对野生和驯养条件下的条纹狼鲈 3 种 GnRH 含量和基因表达的研究结果发现,驯养能显著影响 sbGnRH 的含量及其 mRNA 水平,表明与鱼类生殖相关的 GnRH 的合成和释放在驯养状态下受到影响。最近从鲈形目鱼类中克隆到 3 种 GnRH 和它的 cDNA。研究环境和内分泌因子对这些基因表达的影响有可能简化特异性 GnRH 基因调控方法,有望克服驯养条件对 GnRH 系统的不利影响,最终完成卵母细胞和精子生成过程。性细胞生成的激素调节原理与转基因技术结合有可能建立携带有环境调控因子的转 GnRH 基因鱼类,从而人类可以随意“开启”和“关闭”GnRH 基因,控制性腺发育时间。

参考文献:

- [1] Zohar Y, Mylonas C C. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes[J]. Aquaculture, 2001, 197: 99-136.
- [2] Zohar Y, Tosky M, Pagelson G, et al. Induction of spawning in the gilthead seabream, *Sparus aurata*, using D-Ala-Pro NEt-LHRH; comparison with the use of HCG[J]. Israeli J Aqua Baniageh, 1989, 41(2): 105-113.
- [3] Zohar Y, Goren A, Fridkin M, et al. Degradation of gonadotropin-releasing hormones in the gilthead seabream *Sparus aurata*: II. Cleavage of native salmon GnRH, mammalian LHRH and their analogs in the pituitary, kidney and liver[J]. Gen Comp Endocrinol, 1990, 79: 306-331.
- [4] Zohar Y, Harel M, Hassin S, et al. Gilthead sea bream *Sparus aurata* [A]. Broodstock Management and Egg and Larval Quality [M]. Oxford: Blackwell, 1995. 94-117.
- [5] Zohar Y, Elizur A, Sherwood N M, et al. Gonadotropin-releasing potencies of the three native forms of gonadotropin-releasing hormones present in the brain of gilthead seabream, *Sparus aurata* [J]. Gen Comp Endocrinol, 1995, 97: 289-299.
- [6] Goren A, Zohar Y, Fridkin M, et al. Degradation of gonadotropin releasing hormone in the gilthead seabream, *Sparus aurata*: I. Cleavage of native salmon GnRH, mammalian LHRH and their analogs in the pituitary[J]. Gen Comp Endocrinol, 1990, 79: 291-305.
- [7] Zohar Y. Gonadotropin releasing hormone in spawning induction in teleosts: basic and applied considerations[A]. Reproduction in Fish: Basic and Applied Aspects in Endocrinology and Genetics [M]. Paris: INRA Press, 1988. 47-62.
- [8] Zohar Y, Goren A, Tosky M, et al. The bioactivity of gonadotropin-releasing hormones and its regulation in the gilthead seabream, *Sparus aurata*: in vivo and in vitro studies[J]. Fish Physiol Biochem, 1989, 7: 59-67.
- [9] Crim L W, Sherwood N M, Wilson C E. Sustained hormone release. II. Effectiveness of LHRH analog LHRHa administration by either single time injection or cholesterol pellet implantation on plasma gonadotropin levels in a bioassay model fish, the juvenile rainbow trout[J]. Aquaculture, 1988, 74: 87-95.
- [10] Harmin S A, Crim L W. Influence of gonadotropin hormone-releasing hormone analog GnRH-A on plasma sex steroid profiles and milt production in male winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* Walbaum[J]. Fish Physiol Biochem, 1993, 10: 399-407.
- [11] Dabrowski K, Ciereszko A, Ramseyer L, et al. Effects of hormonal treatment on induced spermiation and ovulation in the yellow perch *Perca flavescens*[J]. Aquaculture, 1994, 120: 171-180.
- [12] Carrillo M, Zanuy S, Prat F, et al. Sea bass *Dicentrarchus labrax* [A]. Broodstock Management and Egg and Larval Quality [M]. Oxford: Blackwell, 1995. 138-168.
- [13] Almendras J M, Duenas C, Nacario J, et al. Sustained hormone release: III. Use of gonadotropin releasing hormone analogues to induce multiple spawnings in sea bass, *Lates calcarifer* [J]. Aquaculture, 1988, 74: 97-111.
- [14] Mylonas C C, Hinshaw J M, Sullivan C V. GnRH-induced ovulation of brown trout *Salmo trutta* and its effects on egg quality [J]. Aquaculture, 1992, 106: 379-392.
- [15] Slater C, Schreck C B, Swanson P. Plasma profiles of the sex steroids and gonadotropins in maturing female spring chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* [J]. Comp Biochem Physiol, 1994, 109A: 167-175.
- [16] Sullivan C V, Berlinsky D L, Hodson R G. Reproduction [A]. Striped Bass and Other Morone Culture [M]. New York: Elsevier, 1997. 11-73.
- [17] Carolsfeld J, Sherwood N M, Kreiberg H, et al. Induced sexual maturation of herring using GnRH α 'quick-release' cholesterol pellets[J]. Aquaculture, 1988, 70: 169-181.
- [18] Sherwood N M, Crim L W, Carolsfeld J, et al. Sustained hormone release. I. Characteristics of in vitro release of gonadotropin-releasing hormone analogue GnRH-A from pellets

- [J]. Aquaculture, 1988, 74: 75-86.
- [19] Breton B, Weil C, Sambroni E, et al. Effects of acute versus sustained administration of GnRH on GnH release and ovulation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. Aquaculture, 1990, 91: 371-383.
- [20] Barbaro A, Francescon A, Bozzato G, et al. Induction of spawning in gilthead seabream, *Sparus aurata* L., by long-acting GnRH agonist and its effects on egg quality and daily timing of spawning[J]. Aquaculture, 1997, 154: 349-359.
- [21] Mylonas C C, Swanson P, Woods III L C, et al. GnRH α -induced ovulation and sperm production in striped bass, Atlantic and Pacific salmon using controlled release devices[A]. Proceedings of the World Aquaculture Congress Torremolinos, 1993.
- [22] Zohar Y. New approaches for the manipulation of ovulation and spawning in farmed fish[J]. Bull Natl Res Inst Aquacult, 1996 (Suppl), 2: 43-48.
- [23] Mylonas C C, Tabata Y, Langer R, et al. Preparation and evaluation of polyanhydride microspheres containing gonadotropin-releasing hormone GnRH, for inducing ovulation and spermiation in fish[J]. J Controlled Release, 1995, 35: 23-34.
- [24] Langer R. Polymer implants for drug delivery in the brain[J]. J Controlled Release, 1991, 16: 53-60.
- [25] Zohar Y, Pagelson G, Gothilf Y. Controlled release of gonadotropin releasing hormones for the manipulation of spawning in farmed fish[J]. Controlled Release Bioact Mater, 1990, 17: 51-52.
- [26] Mylonas C C, Woods III L C, Thomas P. Endocrine profiles of female striped bass *Morone saxatilis* during post-vitellogenesis, and induction of final oocyte maturation via controlled-release GnRH α -delivery systems[J]. Gen Comp Endocrinol, 1998, 110: 276-289.
- [27] Mylonas C C, Magnus Y, Gissis A, et al. Reproductive biology and endocrine regulation of final oocyte maturation of captive white bass[J]. J Fish Biol, 1997, 51: 234-250.
- [28] Mylonas C C, Scott A P, Zohar Y. Plasma gonadotropin II, sex steroids, and thyroid hormones in wild striped bass *Morone saxatilis* during spermiation and final oocyte maturation[J]. Gen Comp Endocrinol, 1997, 108: 223-236.
- [29] Gothilf Y, Meiri I, Elizur A, et al. Preovulatory changes in the levels of three gonadotropin-releasing hormone-encoding messenger ribonucleic acids mRNAs, gonadotropin β -subunit mRNAs, plasma gonadotropin, and steroids in the female gilthead seabream, *Sparus aurata* [J]. Biol Reprod, 1997, 57: 1145-1154.
- [30] Goren A, Gustafson H, Doering D. Field trials demonstrate the efficacy and commercial benefit of a GnRH α implant to control ovulation and spermiation in salmonids[A]. Reproductive Physiology of Fish, 1995. Fish Symposium 95[C]. Texas, 1995. 99-101.
- [31] Haraldsson H, Sveinsson T, Skulason S. Effects of LHRH treatments upon the timing of ovulation and upon egg and offspring quality in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* [J]. Aquacult Fish Manage, 1993, 24: 145-150.
- [32] Fornies M A, Mananos E, Laureau S, et al. Different delivery systems for the optimization of the induction of the spawn in sea bass *Dicentrarchus labrax* [C]. Proceedings of the Aqua 2000, Nice, 2000. 217.
- [33] Larsson D G J, Mylonas C C, Zohar Y, et al. Gonadotropin-releasing hormone-analogue GnRH-A advances ovulation and improves the reproductive performance of a cold-water batch-spawning teleost, the yellowtail flounder *Pleuronectes ferrugineus* [J]. Can J Aquat Fish Sci, 1997, 54: 1957-1964.
- [34] Berlinsky D L, William K, Hodson R G, et al. Hormone induced spawning of summer flounder *Paralichthys dentatus* [J]. J World Aquacult Soc, 1997, 28: 79-86.
- [35] Scott A P, Witthames P R, Vermeirssen E L M, et al. Prolonged-release gonadotrophin-releasing hormone analogue implants enhance oocyte final maturation and ovulation, and increase plasma concentrations of sulfated C steroids in North Sea plaice[J]. J Fish Biol, 1999, 55: 316-328.
- [36] Mugnier C, Guennoc M, Lebegue E, et al. Induction and synchronisation of spawning in cultivated turbot *Scophthalmus maximus* L. broodstock by implantation of a sustained-release GnRH α pellet[J]. Aquaculture, 2000, 181: 241-255.
- [37] Berlinsky D L, King W V, Smith T I J, et al. Induced ovulation of Southern flounder *Paralichthys lethostigma* using gonadotropin releasing hormone analogue implants[J]. J World Aquacult Soc, 1996, 27: 143-152.
- [38] Mylonas C C, Gissis A, Magnus Y, et al. Hormonal changes in male white bass *Morone chrysops* and evaluation of milt quality after treatment with a sustained-release GnRH α -delivery system [J]. Aquaculture, 1997, 153: 301-313.
- [39] Vermeirssen E L M, Scott A P, Mylonas C C, et al. Gonadotropin-releasing hormone agonist stimulates milt fluidity and plasma concentrations of 17, 20-dihydroxylated and 5-reduced, 3-hydroxylated C21 steroids in male plaice *Pleuronectes platessa* [J]. Gen Comp Endocrinol, 1998, 112: 163-177.
- [40] Vermeirssen E L M, Shields R, Mazorra de Quero C, et al. Gonadotropin-releasing hormone agonist raises plasma concentrations of progestogens and enhances milt fluidity in male Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* [J]. Fish Physiol Biochem, 2000, 22: 77-87.
- [41] Solar I I, Smith J, Dye H M, et al. Induced ovulation of chinook salmon using a GnRH α implant: effect on spawning, egg viability and hormone levels[A]. Reproductive Physiology of Fish, 1995. Fish Symposium 95[C]. Texas, 1995. 144.
- [42] Sorbera I. A, Mylonas C C, Zanuy S, et al. Sustained administration of GnRH α increases milt volume without altering sperm counts in the sea bass[J]. J Exp Zool, 1996, 276: 361-368.
- [43] Mylonas C C, Scott A P, Vermeirssen E L M, et al. Changes in plasma gonadotropin II and sex-steroid hormones, and sperm production of striped bass after treatment with controlled-release

- gonadotropin-releasing hormone agonist-delivery systems[J]. Biol Reprod, 1997, 57: 669-675.
- [44] Mylonas C C, Woods III L C, Thomas P, et al. Hormone profiles of captive striped bass *Morone saxatilis* during spermiation, and long-term enhancement of milt production[J]. J World Aquacult Soc, 1998, 29: 379-392.
- [45] Breton B, Gavoroun M, Mikolajczyk T. GTH-I and GTH-II secretion profiles during the reproductive cycle in female rainbow trout: relationship with pituitary responsiveness to GnRH-A stimulation[J]. Gen Comp Endocrinol, 1998, 111: 38-50.
- [46] Henry J C, McLean E, Mayer I, et al. Inductions of precocious maturation in masculinized Atlantic salmon by treatment with sustained-release LHRH and testosterone[J]. Aquacult Int, 1998, 6: 261-268.
- [47] Ohta H, Kagawa H, Tanaka H, et al. Milt production in the Japanese eel *Anguilla japonica* induced by repeated injections of human chorionic gonadotropin[J]. Fish Sci, 1996, 62: 44-49.
- [48] Ohta H, Kagawa H, Tanaka H, et al. Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. Fish Physiol Biochem, 1997, 17: 163-169.
- [49] Sato N, Kawazoe I, Shiina Y, et al. A novel method of hormone administration for inducing gonadal maturation in fish[J]. Aquaculture, 1995, 135, 51-58.
- [50] Sato N, Kawazoe I, Suzuki Y, et al. Development of an emulsion prepared with the lipophilized gelatin and its application for hormone administration in the Japanese eel *Anguilla japonica* [J]. Fish Physiol Biochem, 1997, 17: 171-178.
- [51] Seymour L W, Duncan R, Duffy J, et al. Poly ortho ester matrices for controlled release of the antitumour agent 5-fluorouracil [J]. J Controlled Release, 1994, 31: 201-206.
- [52] 邓岳松, 林浩然, 谢峻, 等. 注射含 HCG 和 CPE 的 W/O/W 复乳诱导日本鳊性腺发育成熟的研究[J]. 中国水产科学, 2001, 8(2): 44-47.
- [53] Lin H R, Xie G, Zhang L H, et al. Artificial induced of gonadal maturation and ovulation in the Japanese eel (*Anguilla japonica*) [J]. Bull Fr Peche Piscic, 1998, 394: 163-176.
- [54] 邓岳松, 林浩然. 埋植雄烯二酮一次诱导雄性日本鳊性腺发育成熟的研究[J]. 海洋科学, 2000, 24 (4): 34-37.
- [55] 张利红, 张为民, 林浩然. 雄烯二酮和甲基睾丸酮诱导雌性日本鳊性腺发育的反馈调节作用[J]. 水产学报, 2000, 24(5): 407-411.
- [56] Powell J F F, Zohar Y, Elizur A, et al. Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brains of one species[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91: 12 081-12 085.
- [57] Gothlf Y, Elizur A, Zohar Y. Three forms of gonadotropin-releasing hormone in gilthead seabream and striped bass: physiological and molecular studies[A]. Reproductive Physiology of Fish. Fish Symposium 95[C]. Texas, 1995. 52-54.
- [58] Gothlf Y, Chow M, Elizur A, et al. Molecular cloning and characterization of a novel gonadotropin-releasing hormone from gilthead seabream *Sparus aurata* [J]. Mar Mol Biol Biotech, 1995, 4: 27-35.

Study advance on induction of gonadal development & maturation and reproductive performance by sustained-hormone-releasing delivery systems in marine fishes

WEN Hai-shen, LIN Hao-ran

(Institute of Aquatic Economic Animal, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Induced gonadal maturation and reproductive performance using sustained-release delivery systems (SRDS) of gonadotropin-releasing hormone analog (GnRH-a), human chorionic gonadotropin (HCG), and rostenedione (ADSD) and 17 α -methyltestosterone (MT), multiple emulsion containing HCG and carp pituitary extraction (CPE) in marine fish are reviewed. GnRH-a SRDS can induce a high serum gonadotropin (GtH) levels and long duration in perciform fish and flounder at the final stages of gonadal development, subsequently, ovulating and spawning. Emulsion HCG SRDS can induce a high serum GtH level and long duration in Japanese eel (*Anguilla japonicus*), and subsequently, the increase of gonadal somatic index (GSI) and the maturation of gonad. A significant induced gonad maturation can be obtained using multiple emulsion containing HCG and CPE SRDS (water/oil/water) in Japanese eel. ADSD and MT SRDS can also induce the gonadal maturation and ovulation in Japanese eel.

Key words: sustained-release delivery systems (SRDS); gonad; maturation; in captivity

Corresponding author: LIN Hao-ran