

棉酚对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) 生殖机能影响的研究

富惠光 叶继丹 卢彤岩 张 良

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070)

摘 要 用含0.1%乙酸棉酚的饲料饲养二月龄尼罗罗非鱼稚鱼四个月, 其增重和血浆睾酮水平与对照鱼无显著差异, 并且同时开始发情、交配和产卵, 生殖腺发育正常, 仅血浆皮质醇水平略高于对照组。实验结果表明, 棉籽饼(粉)内含的棉酚浓度(0.03-0.05%)不会影响尼罗罗非鱼的性腺正常发育和生殖机能。肌肉中棉酚残留量为10.3ppm, 远低于食用油的允许量(200ppm)。

关键词 棉酚, 尼罗罗非鱼, 生殖机能, 残毒

前 言

棉酚是一种多酚类化合物, 存在于棉花的叶、茎及种子中。棉酚对人类和哺乳类有广泛的毒性作用, 包括哮喘、呼吸困难、阻碍生长等, 严重时发生肝肺水肿、胸腔和腹腔积水、肾脏病变及心肌纤维退化^[9]。同时, 棉酚还具有抗生育作用, 对雄性哺乳动物的影响比较明显^[11,12], 睾丸生精上皮对棉酚最敏感、是受损伤最严重的组织^[2]。生精上皮的损伤导致的无精症常发生在机体其他器官的损伤之前。而棉酚对雌性生殖机能的作用——干扰发情周期、阻碍受精和早期胚胎发育常被先行发生的肺、肝脏、肾脏等器官的病变所遮掩^[9]。棉酚对鱼类的毒性作用的研究远不象对哺乳动物的研究深入。目前已报道的资料表明, 虹鳟鱼对棉酚比较敏感^[6], 罗非鱼则无论在饲料较大量使用脱脂棉籽粉和饲料加入棉酚的情况下都能较好的生长, 也不引起中毒和死亡^[4,10]。上述资料表明棉籽饼可以作为某些鱼类的一种饲料蛋白源, 但是棉酚的特异抗雄性生育作用仍是在应用棉籽于鱼类饲料时值得注意的问题, 而棉酚对鱼类是否也如对哺乳类一样有雄性抗生育作用至今还没有研究报道。为了查明这个问题并为棉籽饼用于水产养殖生产提供依据, 我们进行了棉酚对罗非鱼生殖机能影响的研究。

材 料 和 方 法

二月龄的尼罗罗非鱼(体重约20克)购自哈尔滨温流水养殖场, 实验前在两个400升

收稿日期: 1994-06-07。

配有持续充气、循环过滤和恒温控制的玻璃钢水槽中用商品配合饲料喂养驯化。水源为自来水, 每天换水四分之一。两周后开始实验。在整个实验期间, 水温 26–28℃, 人工照明 12h/d。溶解氧饱和值 > 80%, 氨氮 < 0.1 μg/L。

实验组用含 0.1% 乙酸棉酚的全价饲料, 对照组用的饲料除不含棉酚外, 其他成分与实验组相同 (表 1)。植物性材料豆饼粉、麦麸、面粉等预先在 105℃ 恒温烘 1h, 维生素使用医药等级, 矿物盐用分析纯试剂, 乙酸棉酚 (纯度 99.99%, 中国医学科学院北京药物研究所提供) 溶入乙醇后再与其他材料搅拌均匀后在室温下制成颗粒。制成的饲料置冰箱内保存并在一个月内存完。实验鱼每隔半月称重一次以确定投饲量。日投饲率在开始的第一个月是 10%, 以后根据摄食状况逐步降低到 5%。当发现一定数量的实验鱼有交配产卵行为时 (约在实验开始后四个月) 停止实验。将实验鱼取出在 0.1% 苯氧乙醇水溶液中麻醉后, 称重, 尾静脉采血。血液经 10000rpm 离心四分钟, 取血浆在 -80℃ 保存, 在一个月内存完。取精巢立即放在波恩氏液中固定做组织学检查, 取背部肌肉约 2g 做棉酚含量分析。为防止实验鱼因受捕捉刺激不同影响血浆皮质醇激素的测定结果, 我们采用顺序捕捉方法 (sequence capture), 即顺序在对照和实验组每次取五尾鱼麻醉、采血, 以保证对照鱼和实验鱼受到相等的捕捉刺激。

表 1 对照组和实验组使用的饲料成分 (%)

Table 1 Feed composition (%) for control and gossypol (GP) treated Nile tilapia

组 份 (Ingredients)	对照组 (Control)	实验组 (GP-treated)
鱼粉 (Fish meal)	40	40
豆饼粉 (Soybean flour)	20	20
面粉 (Wheat flour)	14	14
麦麸 (Wheat bran)	19.9	19.9
豆油 (Soybean oil)	2	2
复合维生素 * (Vitamin complex)	1	1
复合矿物盐 * (Mineral complex)	3	3
乙酸棉酚 (Gossypol acetate)	0	0.1
纤维素 (Cellulose)	0.1	0

* 每公斤饲料含维生素 A, 3300 IU; D, 3300 IU; B1, 10mg; B2, 10mg; B6, 10mg; B12, 0.04mg; C, 300mg; E, 100mg; K3, 10mg; 烟酸, 50mg; 泛酸钙, 30mg; 氯化胆碱, 800mg; 叶酸, 5mg; 肌醇, 200mg。

** 每公斤饲料含硫酸铜 2mg; 硫酸铁, 8mg; 硫酸镁, 40mg; 硫酸锰, 1.6mg; 硫酸锌, 1.6mg; 氟化钠, 1.6mg; 硫酸钴, 1.2μg; 硒酸钠, 0.4μg。

血浆睾酮和皮质醇的测定。血浆的睾酮和皮质醇含量用上海内分泌研究所生产的药盒在 LKB 液体闪烁仪上进行测定。测得的数据先进行单方差分析, 然后进行 U 检验。

精巢的组织学检查。精巢在波恩氏液中固定后, 乙醇系列脱水后石蜡包埋, 7μm 切片, 苏木精、伊红染色, 在光学显微镜下观察摄影。

肌肉棉酚残留量的测定。肌肉样品混合后在玻璃研钵中研碎, 然后按 Botsoglou^[3]的方法分离和测定游离棉酚。

结 果

在整个实验期间, 按体重的 10% 递降到 5% 的投饲量, 食用含棉酚饲料的罗非鱼和

对照鱼都能及时把投放的饲料食完毕, 没有厌食和食后呕吐等摄食行为发生。在实验进行到三个月时, 棉酚处理和对照鱼同时出现发情和交配行为, 饲喂棉酚的罗非鱼与对照鱼的摄食强度相同, 未见厌食情况发生。在实验进行到三个月时, 棉酚处理的罗非鱼与对照鱼同时出现发情和交配行为, 雌鱼陆续含卵、幼鱼逸出。

用相同的投饲量饲养到实验结束时, 对照组和棉酚处理组的增重、特定生长率和饲料系数等如表 2 所示。由表 2 可知, 食用含棉酚饲料的罗非鱼的增重、特定生长率和饲料系数都不低于对照组。

表 2 用含 0.1% 乙酸棉酚的饲料饲养罗非鱼的生长情况

Table 2 Growth performance of Nile tilapia fed with diet containing 0.1% gossypol acetate (GP)

	始重(克) $W_1(\text{gr.})$	终重(克) $W_2(\text{gr.})$	增重(%) Gain (%)	特殊生长率 Special growth rate	饲料系数 Feed conversion
对照组 Control	25.5	89.2	250	0.61	1.45
实验组 GP-treated	25.6	99.6	289	0.67	1.48

剖检时可发现棉酚处理的罗非鱼和对照鱼都有正常发育的精巢, 对雌鱼的剖检观察也发现有发育各期的卵巢。对雄鱼的生殖腺的显微组织学观察的结果如图 1 所示。精原细胞、初级和次级精母细胞、精细胞以及间质细胞等都呈正常结构, 并显示出活动生殖状态。

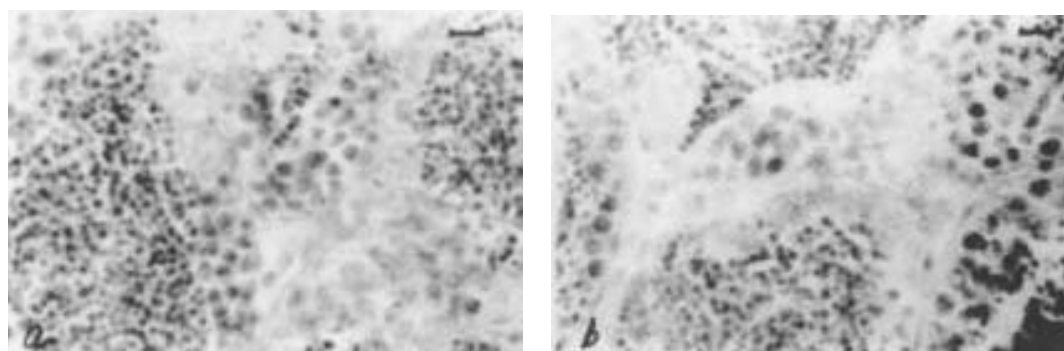


图 1 食用含 0.1% 棉酚饲料的罗非鱼精巢的光学显微照片

Fig. 1 Light micrographs of testis in tilapia fed with diet containing 0.1% gossypol acetate

a: 对照鱼的精巢; b: 食用含棉酚饲料四个月的罗非鱼的精巢;

波恩氏液固定, 苏木精-伊红染色。线段表示 5 微米。

a: testis in control fish.

b: testis in tilapia fed with diet containing 0.1% gossypol acetate for four months.

Boin's fixative, H-E stain. Bar represents 5 μm .

血浆睾酮和皮质醇的放射免疫测定结果如表 3 所示。棉酚处理组和对照组的血浆睾酮水平没有显著差异。而棉酚处理的罗非鱼的血浆皮质醇 (149.9 ± 11.5) 比对照组 (105.5 ± 9.49) 略高, 并具统计学显著性 ($P < 0.05$)

表 3 棉酚对罗非鱼血浆睾酮和皮质醇水平的影响

Table 3 Effect of gossypol (GP) on plasma testosterone and cortisol levels in Nile tilapia

	血 浆 睾 酮(ng / mL) Plasma testosterone mean $\pm$ SEM	血 浆 皮质醇(ng / mL) plasma cortisol mean $\pm$ SEM
对照组 Control	1.862 ± 0.496	105.5 ± 9.49
实验组 GP-treated	0.879 ± 0.160	$149.9 \pm 11.5 *$

* $P < 0.05$

用含棉酚 0.1% 的配合饲料饲养四个月的罗非鱼的肌肉内棉酚含量为 10.3ppm, 而对照鱼肌肉中则检不出棉酚。

讨 论

从上述结果得知, 用高出棉籽饼中正常棉酚含量一倍的饲料饲养罗非鱼四个月时间, 从幼鱼养至性成熟, 未引起任何的食欲不振、及其他可见的毒性反应。其生长速度与对照组无差别。这与我们前期的实验结果*相符。这一结果说明棉籽饼中的棉酚含量对尼罗罗非鱼并无任何可见的毒性作用, 与家畜在饲喂棉籽饼时发生的肺水肿等严重中毒症状有着明显的不同。

经四个月的饲喂, 棉酚处理的罗非鱼与对照鱼同步地进入了性成熟, 雄鱼和雌鱼都正常发情并出现婚姻色, 正常交配、产卵。这表明实验所用的棉酚浓度并不影响罗非鱼的生殖行为和第二性征的发育。生殖腺的解剖可见到发育正常的精巢和各发育时期的卵巢, 与上述的正常生殖行为相符合。由于对哺乳动物大量的研究表明棉酚的抗生育作用主要是对雄性的影响。为此, 着重做了精巢组织切片, 用光学显微镜观察, 精原细胞、初级和次级精母细胞、精细胞、间质细胞都呈正常状态。在输精管中也可观察到正常堆积的成熟精子, 说明了含 0.1% 棉酚的饲料不仅不影响罗非鱼的营养生长, 也不影响性腺正常发育和正常性行为。

棉酚对哺乳动物雄性生殖系统的抑制作用的机理由于实验结果的差异而有两种观点。一种观点认为该药物直接作用于睾丸生殖细胞而对间质细胞和性激素水平无干扰作用^[2]。另一种观点认为棉酚干扰垂体—生殖腺轴。经棉酚处理的大鼠的促性腺激素、

* 叶继丹、卢彤岩、富惠光、张良, 1992。棉酚对罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 幼鱼生长率的影响研究。第一届全国青年学术讨论会(1992 年 8 月, 北京)

睾酮含量显著降低, 睾丸间质细胞退化^[7,8]。我们做的血浆睾酮的测定结果是饲喂含0.1%棉酚饲料的罗非鱼与对照鱼无显著差异, 二者均在成熟雄鱼的正常范围。血浆睾酮的正常数值与观察到的精巢间质细胞的正常组织学形态相符合。说明实验所用棉酚的剂量并不影响睾丸间质细胞的分泌功能, 也说明在该剂量下垂体—生殖腺轴未受影响。

垂体—肾上腺轴的应激反应是动物承受不利刺激和拥挤时常见的现象, 也作为一种对毒物的生理适应反应见于毒物处理的鱼类^[5]。棉酚处理的大鼠的垂体—肾上腺轴呈现进行式回归反应^[13], 与此动物对棉酚的敏感性相符合。用含棉酚的饲料饲养四个月后的罗非鱼血浆皮质醇的浓度虽然高于对照鱼 ($149.9 \pm 11.5 \text{ ng/ml}$ 对 $105.5 \pm 9.49 \text{ ng/ml}$, $P < 0.05$), 但仍然在正常范围之内 ($100\text{--}200 \text{ ng/ml}$ 的皮质醇浓度常在于毒性实验的对照鱼), 受毒物刺激的罗非鱼的血浆皮质醇的浓度可高达正常值的5–10倍^[5]。皮质醇测定的结果说明实验用棉酚剂量并未使实验鱼受到太大的刺激, 实验鱼可以适应。

用含0.1%棉酚的饲料饲养四个月的罗非鱼中棉酚的残留量是10.3ppm, 这和过去报道的用相似含量棉籽饼饲养185天的罗非鱼的肌肉棉酚残留量(9–17ppm)相符, 而且因为此残留量远低于食用油的允许量(200ppm), 食用是安全的^[1]。

总之, 用添加棉籽饼内含二倍的棉酚剂量的饲料将尼罗罗非鱼从稚鱼饲养到性成熟不仅不影响其营养生长, 也未见其影响生殖发育和生殖机能。实验结果说明: 如果仅从棉酚来考虑, 棉籽饼不经任何去毒工艺用作罗非鱼的饲料是完全可行的。

参 考 文 献

- [1] 刘遵津、李家成、韩占江、江丙石, 1993. 虹鳟饲料添加棉仁粉的研究. 水产学杂志, 6(1): 63–66.
- [2] 薛社普、梁德才等, 1983. 棉酚抗精子发生的亚细胞作用位点及其作用机理假说, 57–65. 卫生出版社.
- [3] Botsoglou N A, 1991. Determination of free gossypol in cottonseed and cottonseed meals by second-derivative UV spectrophotometry. J. Agr. Food chem. 39(3): 478–482.
- [4] El-Sayed A F, 1990. Long-term evaluation of cotton seed meal as a protein source for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Lin.). Aquaculture, 84: 315–320.
- [5] Fu H, O M Steinebach, C J A van den Hamer, P H M Balm and R A C Lock, 1990. Involvement of cortisol and metallothionein-like proteins in the physiological responses of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to sublethal cadmium. Aquat. Toxicol. 16: 257–270.
- [6] Herman R L, 1970. Effects of gossypol on rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish Biol. 2(4): 293–304.
- [7] Lin J, E F Murono, J Osterman, H R Nankin and P B, 1981. Gossypol inhibits testicular steroidogenesis. Fertil. Steril. 35: 563–566.
- [8] Paz G F and Z T Homonnai, 1984. Effect of the antifertility agent, gossypol acetic acid, on the metabolism and testosterone secretion of isolated rat interstitial cells in vitro. Contraception 29(6): 543–552.
- [9] Randel R D, Chase C C Jr, Wyse SJ, 1992. Effects of gossypol and cottonseed products on reproduction of mammals. J. Anim. Sci. 70(5): 1628–1638.
- [10] Robinson E H, Rawles S D, and Stickney R R, 1984. Effects of feeding glandless of glanded cotton seed products and gossypol to *Tilapia aurea*. Aquaculture 38: 145–157.
- [11] Shi Q and S Friend, 1983. Gossypol-induced inhibition of Guinea pig sperm capacitation in vitro. Biol. Reprod. 29: 1027–1032.
- [12] Sotelo A, Montalvo I, Crail M L and Gonzalez-Garza T, 1982. Infertility in male rats induced by diets containing whole cottonseed flour. J. Nutr. 112: 2052–2057.
- [13] Udoh P, Patil D R, 1992. Effects of gossypol acetate on pituitary-adrenal axis in male albino rats. Contraception 45(3): 263–271.

EFFECT OF GOSSYPOL ON REPRODUCTIVE FUNCTIONS OF NILE TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

Fu Huiguang Ye Jidan Lu Tongyan Zhang Liang

(Heilongjiang River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin, 150070)

ABSTRACT Fingerlings of Nile tilapia were fed on a formulated diet containing 0.1% gossypol acetate for four months. Gossypol treated fish sexually matured and started mating and breeding at the same time as the control fish. Anatomical and histological examinations of gonads in both control and GP-treated fish showed normal structure. Plasma testosterone level in GP-treated tilapia was not significantly different from that in control fish, while plasma cortisol level in GP-treated fish showed a slight higher than that in the control. The above results demonstrated that gossypol level in cottonseed cake inhibited neither gonad development not reproductive functions of Nile tilapia. Weight gain and feed conversion of GP-treated fish were not lower than that of control. The residue of gossypol in muscle of GP-treated fish was 10.3ppm, much lower than the maximum allowable gossypol concentration for edible oil(200 ppm).

KEYWORDS Gossypol, Reproduction, Nile tilapia, Residue