

## 17 $\beta$ -雌二醇对鲮早期精子发生的影响及其作用机制

宋海霞, 翁幼竹, 方永强

(国家海洋局 第三海洋研究所, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 应用组织学和免疫组织化学的方法, 对17 $\beta$ -雌二醇(E<sub>2</sub>)影响鲮(*Mugil cephalus*)早期精巢的精子发生及其作用机制进行了研究。饲喂含15 mg/kg和50 mg/kg 17 $\beta$ -雌二醇的饲料60 d, 以不添加17 $\beta$ -雌二醇的饲喂组为对照。结果表明, 幼鲮投喂含E<sub>2</sub>饲料前, 对照组和实验组精巢均属早期精巢, 胞囊中原始的精原细胞占优势, Sertoli细胞紧贴精原细胞。投喂含E<sub>2</sub>饲料后1个月, 低剂量组(15 mg/kg)的4尾幼鲮均出现精原细胞的有丝分裂, 有丝分裂细胞的数量多于高剂量组(50 mg/kg), 对照组精巢未见精原细胞的有丝分裂, 说明E<sub>2</sub>能够诱发精原细胞的分裂。实验结束后投喂E<sub>2</sub>组精巢发育处在小生长期, 可见精巢中有初级精母细胞存在于精小叶中, 而对照组刚刚出现精原细胞的发育分化。用雌激素受体 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚型抗体进行免疫组织化学染色发现, 对照组和实验组早期精巢中的精原细胞和sertoli细胞均显示强的免疫阳性反应, 这为E<sub>2</sub>诱发精原细胞有丝分裂的作用机制提供了新的形态学证据。[中国水产科学, 2009, 16(5): 712–717]

**关键词:** 鲮; 精子发生; 17 $\beta$ -雌二醇; 免疫组织化学

**中图分类号:** S91

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005–8737–(2009)05–0714–06

鲮(*Mugil cephalus*)广泛分布于热带与亚热带海域, 为世界性养殖鱼类, 也是中国东南沿海地区重要的养殖鱼类之一。由于鲮在水产养殖中占有的重要的地位, 从1930年开始, 世界各国就开展了人工繁殖实验, 中国台湾于1977年获得鲮人工繁殖成功, 但尚未取得生产性突破<sup>[1–2]</sup>。有关鲮生殖细胞的发生及其内分泌调控, 已有许多学者进行了研究。何大仁等<sup>[3]</sup>对厦门杏林湾鲮性腺进行了组织学研究。林君卓等<sup>[4]</sup>和洪万树等<sup>[5]</sup>对鲮精子发生过程进行了组织学和超微结构的观察, 将其精巢发育过程划分为5个时期, 揭示了鲮精子发生的生物学特点。方永强等<sup>[6]</sup>研究发现, 17 $\alpha$ -甲基睾酮可诱发鲮精巢的精子发生和释精, 并发现间质细胞在精子发生中起着重要的作用。最近, O'Donnell等<sup>[7]</sup>在对啮齿类的研究中发现, 雌激素在精子发生中起着重要的作用, 从而提出把雌激素物质看作为“雄性激素”的新概念。此后, Bouma等<sup>[8]</sup>

利用漂浮器官培养系统进一步发现, 17 $\beta$ -雌二醇(E<sub>2</sub>)能够增强精子发生之前未成熟虹鳟间质细胞的增殖。近10年来, 关于雌激素影响鱼类精子发生及其作用机制已成为研究鱼类精巢发育内分泌调节的新热点<sup>[9–14]</sup>, 而国内有关雌激素影响鱼类精子发生的研究则少见报道, 因此, 在笔者前期研究雄激素诱发鲮精子发生工作的基础上<sup>[6]</sup>, 进一步探讨17 $\beta$ -雌二醇对鲮早期精子发生的影响及作用机制, 旨在为鱼类精子发生的内分泌调控提供新的资料。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验鱼

6月中旬从龙海海水鱼类养殖场购买100多尾雄性鲮带回实验室, 该鲮取自同批野生鱼苗, 经人工养殖2个多月后体长10 cm左右、体质量20.5~22.10 g, 性腺刚开始发育。将该鱼随机分为高剂量组、低

收稿日期: 2009–02–07; 修订日期: 2009–03–02.

基金项目: 国家海洋局第三海洋研究所基本科研业务费专项资金资助项目(海三科2008011).

作者简介: 宋海霞(1977–), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事海洋动物生殖生理方面的研究. Tel: 0592-2195908; E-mail: songhaixia@163.com

剂量组 and 对照组 3 个组, 每组 30 尾, 每组设 2 个平行。各组分开养殖在小的养殖池中, 暂养 1 周待恢复摄食后, 开始进行实验。

### 1.2 含雌激素饲料的配制

高剂量组和低剂量组 17 $\beta$ -雌二醇 (Estradiol-17 $\beta$ , E<sub>2</sub>, 美国 Sigma 公司产品) 的添加剂量分别为 50 mg/kg 和 15 mg/kg 饲料。其配制方法是预先将雌二醇溶解在医用 100% 酒精中, 然后均匀喷在颗粒饲料上, 反复混合均匀, 而对照组饲料仅喷洒不含雌激素的等量酒精, 用处理过的饲料分别投喂 3 组鲮, 每天上午 8:00 左右各组分别投喂质量为体质量 1% 的处理饲料, 待摄食完毕, 下午 3:00 左右再投喂正常饲料, 每天饲料投喂总量不超过体质量的 2.5% ~ 3%, 实验持续 60 d。

### 1.3 样品制备

实验开始前先从各组取雄鱼 2 尾, 作为实验前精巢的发育水平对照, 实验开始后每 2 周抽样检查各实验组和对照组鱼性腺发育情况, 第 1 次各组取 2 尾, 之后各组取 4 尾, 60 d 后将动物全部处死。实验鱼先用丁香酚麻醉, 然后打开腹部仔细分离位于腹腔背面的线状精巢, 一侧精巢放入 Bouin-Hollane 氏液中, 另一侧精巢放入不含醋酸的 Bouin 氏液中, 分别固定 6 ~ 8 h, 系列酒精脱水, Paraplast 包埋, 连续横切片, 切片厚 5 ~ 6  $\mu$ m, 苏木精-伊红染色, 用于观察鲮精巢发育的形态特点和分析 E<sub>2</sub> 对其精巢发育的影响。

### 1.4 免疫组织化学

切片经脱蜡水化后, 浸入 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-甲醇液中 10 min, 以灭活内源性过氧化物酶。按 SABC(抗生物素-生物素-过氧化物酶复合物) 法进行免疫组织化学反应。蒸馏水轻洗后, 在 0.01 mol/L PBS(pH 7.2 ~ 7.4) 中浸泡 5 min, 然后滴加 1:10 (V/V) 的正常山羊血清封闭液, 室温下孵育 10 ~ 20 min, 以减少非特异性染色。滴加第一抗体, 兔抗人雌激素受体亚型  $\alpha$  和  $\beta$  抗体 (分别以体积比 1:600 和 1:300 稀释), 4  $^{\circ}$ C 孵育 36 ~ 48 h。PBS 轻洗后, 滴加 SABC 复合物, 在室温下孵育 30 ~ 40 min, PBS 轻洗, 最后用 3',3'-二氨基联苯胺 (DAB) 显色 10 ~ 20 min。对照实验切片采用 PBS、正

常兔血清替代第一抗体进行同步孵育, 染色结果为阴性。

## 2 结果与分析

### 2.1 鲮早期精巢的形态结构

饲喂 E<sub>2</sub> 前抽样解剖实验组 (高剂量、低剂量) 和对照组鲮精巢, 切片观察精子发生情况。结果显示, 3 组精巢形态结构和发育水平类似。其精巢均为线条状, 外被一层薄的结缔组织, 生殖上皮随结缔组织向内延伸, 在精巢内形成许多管状的精小管, 这些精小管在精巢内互相连接形成精小叶, 最后这些输出小管汇合形成一条大的输精管, 开口在直肠与输尿管之间的泄殖乳突上。切片观察结果显示, 鲮精子发生的排列方式属叶状结构 (Lobular structure), 它们均为早期发育精巢, 其共同特点是多个精原细胞 (通常 3 ~ 5 个, 有的多达 8 个) 被结缔组织包裹在一起, 呈不规则形或长椭圆形, 细胞沿管周排列, 形成胞囊结构 (图版 I-1)。胞囊内可见 2 种类型精原细胞: 一种是原始的精原细胞 (Primordial spermatogonia, 或称为 A 型精原细胞), 其特点是细胞体积大, 为卵圆形或椭圆形, 紧贴生殖上皮, 胞径 15.38 ~ 19.24  $\mu$ m, 核径 8.78 ~ 12.09  $\mu$ m, 核居中或偏于一侧, 有 1 个核仁, 着色较深, 核质分布较均匀, 核膜清晰, 胞质着色差。另一种是 B 型精原细胞, 靠近生殖上皮, 细胞为椭圆形, 胞径 8.45 ~ 12.32  $\mu$ m, 核径 5.12 ~ 7.84  $\mu$ m, 核位于中央, 有 1 个大的核仁, 居中或偏于一侧, 核质嗜碱性很弱, 细胞质不着色 (图版 I-2)。精原细胞外为 Sertoli 细胞所包围, Sertoli 细胞在光镜下只能见到细胞核, 为不规则形、椭圆形或长形, 在光镜下常可见 Sertoli 细胞紧贴精原细胞 (图版 I-1、2、3)。此时, 在生精小管内有多个胞囊组成, 在早期胞囊中可见原始的精原细胞与 Sertoli 细胞紧密排列。

### 2.2 17 $\beta$ -雌二醇对精巢发育的影响

在 7 月上旬, 实验组 (高剂量、低剂量组) 和对照组雄鱼精巢切片没有显著差异。但从 7 月 15 后进行精巢切片观察发现, 实验组精巢发育出现明显的变化, 用高倍和油镜观察均发现低剂量组 4 尾鲮早期精

巢中均出现精原细胞的有丝分裂,其特征为核内染色质的凝集(图版I-4,5),而高剂量组虽然也见精原细胞的有丝分裂,但进入分裂的精原细胞数量显然没有低剂量组多(图版I-6),而对照组在多个切片中均未见此现象(图版I-7)。8月中旬,对低剂量和高剂量实验组组织切片的观察结果显示,此时精巢发育为Ⅱ期,其特点是除靠近生殖上皮有多层精原细胞以及紧贴其边缘的Sertoli细胞外,还可见初级精母细胞位于精小叶的中部,表明精巢发育进入小生长时期(图版I-8,9)。对照组精巢也出现进一步发育,表现在精原细胞开始发育分化,有少数初级精母细胞分散在精小叶中,但精巢发育仍处于I-Ⅱ期(图版I-10)。

### 2.3 雌二醇诱发精原细胞分裂的机制

用雌激素受体 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚型抗体对鲮早期精巢进行免疫组织化学研究。结果显示,对照组与低、高剂量组精巢的精原细胞和Sertoli细胞对这2种受体亚型显示免疫活性,阳性物质定位在沿胞膜分布的胞质或细胞核(图版I-11~14),这为研究17 $\beta$ -雌二醇诱发精原细胞有丝分裂的机制提供了形态学证据。

## 3 讨论

鱼类精子发生由3个主要时相组成,即精原细胞有丝分裂增殖,精母细胞成熟分裂和精子形成<sup>[9]</sup>。研究表明,雄性鱼类精子发生的内分泌调节像其他脊椎动物一样,也受到腺垂体分泌的黄体生成素(Luteinizing hormone, LH)和卵泡刺激激素(Follicle stimulating hormone, FSH)调节, LH通过它的靶细胞—Leydig细胞(间质细胞)受体的表达,产生类固醇激素11-酮基睾酮(11-ketotestosterone, 11-KT)(被公认为硬骨鱼类一种潜在雄激素)激活精子发生<sup>[10-11]</sup>。长期以来一直认为雄激素中主要是11-KT能够激活精原细胞的增殖。然而,最近研究表明,鱼类精子发生,从精原干细胞更新到精子成熟都是受类固醇激素的控制。日本学者Miura等<sup>[12]</sup>以日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)为模型来研究鱼类精子发生,采用埋植和离体器官培养技术,发现E<sub>2</sub>可有效地诱导日本鳗鲡

在体精巢和离体培养精巢组织精原细胞干细胞的分裂,并且这种分裂可被三苯氧胺(Tamoxifen,一种抗雌激素受体药品)所抑制,这表明雌激素在精子发生早期是一种不可缺少的“雄激素”。Miura等<sup>[13]</sup>还使用离体精巢悬浮器官培养系统来揭示类固醇激素诱发鳗鲡精子发生的内分泌机制,研究结果有力地证明了精原细胞干细胞的更新受天然雌激素E<sub>2</sub>的调节,而11-KT则起诱导和促进作用。Bouma等<sup>[8]</sup>利用离体漂浮器官培养系统还发现,将浓度为18.3 nmol/L的E<sub>2</sub>加入到培养基能明显增加虹鳟间质细胞的增殖。而此前先用雌激素受体拮抗剂处理则无这种增殖效应。他们认为E<sub>2</sub>能够增强精子发生之前未成熟虹鳟间质细胞的增殖。本研究通过将E<sub>2</sub>拌在饲料中投喂性腺刚分化的雄性幼鲮,持续投喂1个月后,发现低剂量和高剂量组均出现精原细胞的有丝分裂,且低剂量组精原细胞分裂数量多于高剂量组,而对照组精巢则没有出现这种变化。从而证实,投喂E<sub>2</sub>也能够有效诱导精原细胞的增殖。同时,本研究还进一步观察到E<sub>2</sub>有促进精子发生的作用,其证据为实验结束(60 d)后检查精巢组织切片,实验组精巢已进入小生长时期,精巢中出现初级精母细胞,而对照组精巢则没有观察到以上现象。关于E<sub>2</sub>诱导精原细胞增殖的机制,本研究的结论与Miura等<sup>[12-13]</sup>和Bouma等<sup>[8]</sup>的结论一致,即E<sub>2</sub>首先必须通过与其相应受体结合,诱发细胞生理效应。应用雌激素受体拮抗剂使E<sub>2</sub>的生理效应消失就是一个例证。但是,这些学者没有进一步检查实验鱼精巢中精原细胞是否存在雌激素受体,为此,本研究采用免疫组织化学技术对雌激素2种亚型受体进行定位,结果发现,实验组和对照组幼鲮早期精原细胞均存在这2种亚型受体,阳性物质定位在胞核和沿胞膜分布的胞质。此结果不但证实了雌激素受体在鲮性腺的定位<sup>[14]</sup>,还为Miura等<sup>[12]</sup>和Bouma等<sup>[8]</sup>提出的E<sub>2</sub>诱导精原细胞增殖的作用是通过其受体介导这一推断提供了新的证据。本研究认为E<sub>2</sub>诱导幼鲮精原细胞的有丝分裂机制还十分复杂,不仅仅简单地是E<sub>2</sub>通过雌激素受体的介导就能够诱导精原细胞的有丝分裂,因为E<sub>2</sub>和11-KT



的作用还受到Sertoli细胞产生的其他因子的调节<sup>[13]</sup>。本实验也观察到Sertoli细胞存在雌激素受体,提示 $E_2$ 的作用与Sertoli细胞功能之间存在密切关系,它们内在的复杂关系有待深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 廖一久. 乌鱼完全养殖试验[J]. 台湾水产学会刊, 1977, 5: 1-10.
- [2] 叶金聪, 蔡良候, 郑镇安, 等. 鲮鱼人工育苗的研究[J]. 台湾海峡, 1977, 16(3): 260-263.
- [3] 何大仁, 肖金华, 石燕飞. 厦门杏林湾普通鲮鱼性腺组织学研究[J]. 水产学报, 1981, 5(4): 329-342.
- [4] 林君卓, 翁幼竹, 方永强, 等. 鲮鱼精子发生的组织学研究[J]. 台湾海峡, 2001, 20(1): 57-61.
- [5] 洪万树, 翁幼竹, 林君卓, 等. 鲮鱼精子发生和形成的超微结构研究[J]. 海洋学报, 2001, 23(5): 116-121.
- [6] 方永强, 李正森.  $17\alpha$ -甲基睾酮刺激鲮鱼精子发生机制的初步研究[J]. 海洋与湖沼, 1989, 20(1): 10-14.
- [7] O'Donnell L, Robertson K M, Jones M E, et al. Estrogen and spermatogenesis [J]. Endocr Rev, 2001, 22: 289-318.
- [8] Bouma J, Cloud J G, Nagler J J. In vitro effects of estradiol-17 beta on myoid and fibroblastic cell proliferation in the immature rainbow trout testis [J]. Fish Physiol Biochem, 2003, 28: 191-192.
- [9] Schulz R W, Miura T. Spermatogenesis and its endocrine regulation [J]. Fish Physiol Biochem, 2002, 26: 43-56.
- [10] Holdcraft R W, Braun R E. Hormonal regulation of spermatogenesis [J]. Intl J Androl, 2004, 27: 335-342.
- [11] Schulz R W, Cavaco J E B, Santos E M, et al. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish [J]. Comp Biochem Physiol, 2001, 129B: 407-417.
- [12] Miura T, Miura C, Ohta T, et al. Estradiol-17beta stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 264: 230-234.
- [13] Miura T, Miura C. Japanese eel: A model for analysis of spermatogenesis [Review] [J]. Zool Sci, 2001, 18: 1 055-1 063.
- [14] 方永强, 张为民, 翁幼竹.  $17\beta$ -雌二醇促进鲮鱼性腺发育的作用机制: 雌激素受体的定位[J]. 台湾海峡, 2003, 22: 422-426.

---

## 欢迎订阅2010年《农业质量标准》

主管 中华人民共和国农业部

主办 中国农业科学院

协办 农业部农产品质量安全中心

承办 中国农科院农业质量标准与检测技术研究所

**主要栏目:** 本刊特稿、本刊专稿、本刊专访、专家点评、专题论坛、政策法规、农产品质量安全、农业标准化、无公害农产品、绿色食品、有机农产品、农产品地理标志、学科建设与发展、标准制定与实施、质量认证与管理、质量监督与检验、检验检测体系建设、农业标准公告、研究与探讨、海外博览、名企名品、市场信息与动态、编读园地等。

**读者对象:** 与农产品质量安全、农业质量标准和检验检测有关的各级行政管理、科研教学、检验监测、技术推广、生产企业等部门的相关人员。

本刊为双月刊,逢双月10日出版。大16开本,彩色四封,64页。全国各地邮局(所)均可订阅,也可直接到本刊编辑部办理订阅手续。**邮发代号: 82-223**,每册定价: 10.00元,全年共60.00元。

**通讯地址:** 北京中关村南大街12号中国农科院《农业质量标准》编辑部 邮政编码: 100081

**联系电话/传真:** (010) 82106522、82106521 E-mail: aqs@caas.net.cn

欢迎各界朋友赐教、赐稿、订阅和刊登广告。

## Effects and mechanism of estradiol-17 $\beta$ on early spermatogenesis of grey mullet, *Mugil cephalus*

SONG Hai-xia, WENG You-zhu, FANG Yong-qiang

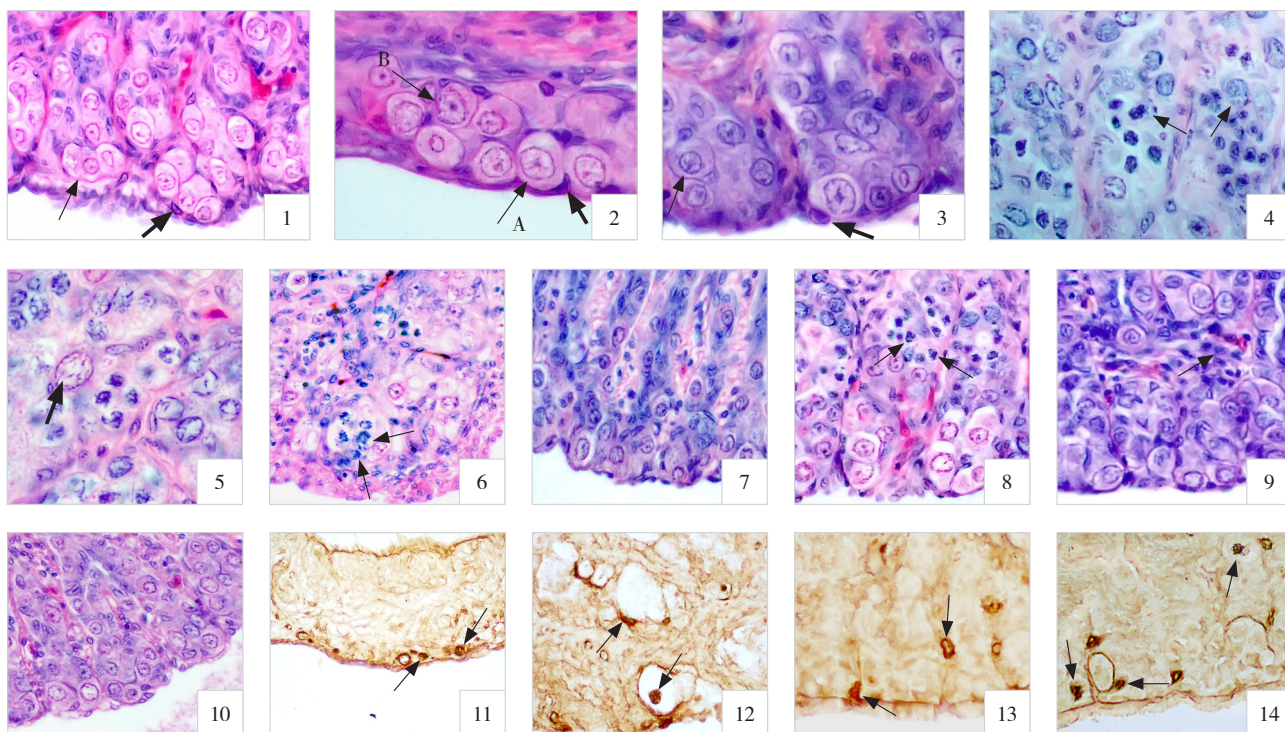
(The Third Institute of Oceanography of the State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Using histological and immunohistochemical methods, the effects and mechanism of estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) on early spermatogenesis of grey mullet, *Mugil cephalus* were investigated. Experimental groups were fed with commercial diet containing 15 mg/kg (low dosage) and 50 mg/kg (high dosage) estradiol-17 $\beta$  for 60 days. Control group was fed with basic feed without additive. Results indicated that testises of experimental and control groups were both in the same developmental level at the beginning of the experiment, and the primordial spermatogonia absolutely predominated in cyst with sertoli cells clinging to spermatogonia. After 1 month feeding, mitosis in spermatogonia could be observed in experimental groups with mitosis cell number in low-dose group significantly more than that in high-dose group, and no mitosis was observed in control group. Above results showed E<sub>2</sub> could hasten cell's division. At the end of the experiment, primary spermatocytes could be found in seminiferous lobules of testis in experimental group. However, at the same time spermatogonia just began to differentiate in control group. Estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  subtypes in the early testis of grey mullet were localized in spermatogonia and sertoli cells by using immunohistochemical method, which provided morphological evidence for deeply studying the mechanism of E<sub>2</sub> in inducing spermatogonia's mitosis. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (5): 712–717]

**Key words:** *Mugil cephalus*; spermatogenesis; estradiol-17 $\beta$ ; immunohistochemistry

宋海霞等: 17 $\beta$ -雌二醇对鲮早期精子发生的影响及其作用机制

SONG Hai-xia et al: Effects and action mechanism of estradiol-17 $\beta$  on early spermatogenesis of grey mullet, *Mugil cephalus*



图版 I

1: 精原细胞(箭头), sertoli细胞(粗箭头)  $\times 560$ . 2: 低剂量组鲮精巢, A型精原细胞(箭头A), B型精原细胞(箭头B), sertoli细胞(粗箭头)  $\times 840$ . 3: 高剂量组精巢, 原始精原细胞(箭头), sertoli细胞(粗箭头)  $\times 840$ . 4: 低剂量组投喂 17 $\beta$ -雌二醇 30 d后, 可见精原细胞有丝分裂(箭头)  $\times 840$ . 5: 图4的放大, 可见有丝分裂前期的染色质凝集(箭头)  $\times 1\ 200$ . 6: 高剂量组可见少数有丝分裂精原细胞(箭头)  $\times 750$ . 7: 对照组精巢未见精原细胞有丝分裂  $\times 560$ . 8: 投喂结束后, 低剂量组鲮精巢进入小生长期, 可见初级精母细胞(箭头)  $\times 700$ . 9: 投喂结束后, 高剂量组精巢可见初级精母细胞(箭头)  $\times 840$ . 10: 投喂结束后, 对照组精巢出现精原细胞的变化  $\times 700$ . 11: 对照组雌激素受体 $\alpha$ 亚型定位于精原细胞核或胞质(箭头)以及sertoli细胞(粗箭头)  $\times 280$ . 12: 低剂量组雌激素受体 $\alpha$ 亚型定位于精原细胞核(箭头)或胞质以及sertoli细胞(粗箭头)  $\times 450$ . 13: 对照组雌激素受体 $\beta$ 亚型定位于精原细胞核(箭头)和sertoli细胞(粗箭头)  $\times 840$ . 14: 高剂量组雌激素受体 $\beta$ 亚型定位于精原细胞核(箭头)和sertoli细胞(粗箭头)  $\times 750$ .

Plant I

1: spermatogonium (arrow), sertoli cell (thick arrow),  $\times 560$ . 2: Testis of grey mullet in low-dose group, type A spermatogonium (arrow A), type B spermatogonium (arrow B), sertoli cell (thick arrow),  $\times 840$ . 3: Testis in low-dose group. Primordial spermatogonia (arrow), sertoli cell (thick arrow),  $\times 840$ . 4: Spermatogonia, in mitosis after feeding estradiol-17 $\beta$  for a month (arrow),  $\times 840$ . 5: Magnification of figure 4, chromatin condensation in mitotic prophase (arrow),  $\times 1\ 200$ . 6: There were few spermatogonia in mitosis (arrow) in high-dose group,  $\times 750$ . 7: There were no spermatogonia in mitosis in control group,  $\times 560$ . 8: Testis of grey mullet in low-dose group entering into primary spermatocyte stage (arrow) at the end of feeding,  $\times 700$ . 9: Primary spermatocytes in high-dose group at the end of feeding,  $\times 840$ . 10: Spermatogonia in control group changed at the end of feeding,  $\times 700$ . 11: ER- $\alpha$  were localized in nucleus or cytoplasm of spermatogonia (arrow) and in sertoli cells (thick arrow) in control group,  $\times 280$ . 12: ER- $\alpha$  were localized in nucleus or cytoplasm of spermatogonia (arrow) and in sertoli cells (thick arrow) in low-dose group.  $\times 450$ . 13: ER- $\beta$  were localized in nucleus (arrow) of spermatogonia and sertoli cells (thick arrow) in control group,  $\times 840$ . 14: ER- $\beta$  were localized in nucleus (arrow) of spermatogonia and sertoli cells (thick arrow) in high-dose group,  $\times 750$ .