

# 鲤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

汪小东 林浩然

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

谢 刚

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380)

**摘 要** 雄鳗注射 5~6 次、雌鳗注射 9~10 次鲤脑垂体匀浆液(CPE) + 人绒毛膜促性腺激素(HCG)能分别诱导精巢和卵巢发育成熟。在雌雄鳗鲡, 注射 CPE+ HCG 可显著增加端脑、间脑、中脑和下丘脑 mGnRH 的含量, 而对后脑和延髓 mGnRH 的影响较小; 注射 CPE+ HCG 增加雄鳗后脑和延髓 cGnRH- II 含量, 对雌鳗脑区 cGnRH- II 则无显著影响。雌雄鳗鲡每次注射 CPE+ HCG 后 1 天, 血清促性腺激素(GtH)急剧上升, 10 天后逐渐下降, 但雌鳗在注射 7 次后 10 天血清 GtH 水平仍然显著高于相应对照组。雄鳗注射 CPE+ HCG 1~4 次后, 血清睾酮浓度无显著变化; 雌鳗每次注射 CPE+ HCG 后, 血清睾酮浓度升高并一直维持在较高水平。雌鳗血清  $17\beta$ - 雌二醇浓度在注射 4~6 次期间与对照组无显著差异, 注射 7 次后显著上升。

**关键词** 鳗鲡, 鲤脑垂体匀浆液, 人绒毛膜促性腺激素, 促性腺激素释放激素, 促性腺激素, 性类固醇激素

## Effect of combinative injection of carp pituitary extraction and human chorionic gonadotropin on brain gonadotropin-releasing hormone and serum gonadotropin and sex steroids contents in *Anguilla japonica*

Wang Xiaodong, Lin Haoran

(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Xie Gang

(Pearl River Fishery Research Institute, CAFS, Guangzhou 510380)

**ABSTRACT** The testes and ovarian development and maturation were achieved by combinative injection of carp pituitary extraction(CPE) and human chorionic gonadotropin (HCG) for 5-6 times in male and 9-10 times in female Japanese eel(*Anguilla japonica*). The mGnRH contents in the telencephalon, diencephalon, mesencephalon and hypothalamus significantly increased after injection of CPE+ HCG in male and female Japanese eel, but contents in the metencephalon and myelencephalon did not change. Injection of CPE+ HCG also increased the cGnRH- II contents in the metencephalon and myelencephalon in male Japanese eel, but had no effect in the female. The serum GtH levels in male and female Japanese eel increased dramatically 1 day after each injection of CPE+ HCG, then gradually decreased 10 days after. However the serum GtH levels in female Japanese eel remained significantly higher than the corresponding control in 10 days after 7 injections. The serum

国家自然科学基金资助项目(激素诱导鳗鲡卵母细胞最后成熟和产卵), 39770101 号和 1997 高校博士点专项科研基金资助项目(鳗鲡生殖活动的神经内分泌调节机理研究)。

第一作者简介: 汪小东, 男, 1967 年 7 月生, 博士。Tel: 020-84110188, E-mail: wangxd@public.guangzhou.gd.cn

收稿日期: 1999-03-12

testosterone concentration increased after injection of CPE+ HCG and kept on a high level in female Japanese eel, but did not change during the time of 1- 4 injection in male Japanese eel. The serum  $17\beta$ - estradiol contents were not different with the corresponding controls during 4- 6 injections in female Japanese eel, but increased after 7 injections.

**KEYWORDS** *Anguilla japonica*, carp pituitary extraction, human chorionic gonadotropin, gonadotropin-releasing hormone, gonadotropin, sex steroids

注射鱼类脑垂体匀浆液和人绒毛膜促性腺激素诱导鳗鲡性腺发育成熟的方法已用于鳗鲡人工繁殖的研究, 虽然不同研究者所采用的脑垂体种类、催熟剂量、注射间隔时间等有所不同, 但都取得较好的催熟效果, 得到的成熟亲鳗可诱导排卵和受精并得到幼苗<sup>[1, 2]</sup>。然而, 用这种方法得到的幼苗在孵出后 10 ~ 15 天大量死亡。其原因除了可能存在的生态条件不适外, 不少学者提出用注射鱼类脑垂体匀浆液的方法诱导的鳗鲡成熟是异常发育<sup>[3, 4]</sup>。遗憾的是, 注射外源促性腺激素诱导鳗鲡性腺发育过程的内分泌调控机理的报道很少, Ijiri<sup>[4]</sup>报道用注射鲑脑垂体诱导鳗鲡性腺发育成熟过程中类固醇激素含量的变化。本文采用 CPE 和 HCG 混合注射的方法诱导鳗鲡性腺发育成熟, 系统测定诱导鳗鲡性腺发育成熟过程中下丘脑—脑垂体—性腺轴中各个水平的激素含量变化, 以阐明外源促性腺激素诱导鳗鲡性腺发育成熟的内分泌调控机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

实验用鳗鲡(*Anguilla japonica*) 为广东省珠江口渔民捕获的下海生殖洄游的鳗鲡。雄鱼 36 尾, 体长 42~ 57 cm, 体重 120~ 260 g; 雌鱼 63 尾, 体长 57~ 78 cm, 体重 290~ 490g。实验鱼蓄养于循环水族箱中, 暂养 10~ 15 天, 然后逐步适应盐度为 25~ 30 的人工海水, 自然水温(12~ 25℃) 和光照, 于 1995 年 11 月至 1996 年 5 月、1996 年 11 月至 1997 年 5 月间进行两批实验。

### 1.2 鲤脑垂体匀浆液的制备和注射方法

鲤脑垂体取自广州市农贸市场, 保存在纯丙酮中。注射前用玻璃匀浆器磨碎, 悬浮在 Ringer 氏液中。注射剂量为: 雌鱼每尾 2.0 mg 脑垂体+ 100 IU HCG, 雄鱼减半, 胸鳍基部注射。间隔 10 天注射一次。对照组鳗鲡注射 Ringer 氏液。

### 1.3 样品收集和处理

#### 1.3.1 脑组织样品

雄鳗在注射前[性腺成熟系数 GSI: (0.42 ± 0.07) %]、注射 4 次后 1 天[GSI: (1.27 ± 0.41) %]、注射 5 次后 1 天[GSI: (3.42 ± 0.54) %]; 雌鳗在注射前[GSI: (2.06 ± 0.36) %]、注射 6 次后 1 天[GSI: (21.66 ± 3.94) %]、注射 10 次后 1 天[GSI: (50.78 ± 6.41) %]取脑组织样品。取样时用碎冰将鳗鲡麻醉, 切断脊椎, 迅速取出脑组织置于冰浴的离心管中。脑组织分区参考文献[5]的方法分成三部分: A 部分为端脑; B 部分包括间脑、中脑和下丘脑; C 部分包括后脑和延髓。脑组织促性腺激素释放激素的抽提参考文献[6]的方法稍做修改, 脑组织加入 1 mL 冰冷的 2 mol/L 乙酸后, 用超声波匀浆器匀浆, 4℃、15 000 r/min 离心 15 min, 取上清液在冷冻干燥仪上干燥, 再重新溶解在测定用的磷酸缓冲液中(10 mmol Tris, pH 7.4, 含 0.5% BSA), 贮存于- 20℃待测 mGnRH 和 cGnRH- II 含量。

#### 1.3.2 血清样品

雄鳗共注射 5~ 6 次, 分别于注射前和第 1、2、3、4、5 次注射后 1 天和 10 天取血清样品; 雌鱼共注射 9~ 10 次, 分别于注射前和第 4、5、6、8 次注射后 1 天和 10 天取血清样品, 还在注射 8 次后 1、3、5、7、10 天

取血清样品以观察注射 CPE+ HCG 后鳊血清激素含量的动态变化。取血清样品时,将鳊用碎冰麻醉,用 1 mL 注射器从尾静脉取血,静置 4h 后离心,血清贮存于-20℃待测各种激素含量。取样时,解剖鱼体,计算成熟系数。

## 1.4 激素含量的测定和数据处理

鳊脑区 GnRH 含量的测定参考文献[7]建立的欧洲鳊 GnRH 的测定方法,最小可测为 20 pg/mL;血清 GtH 含量测定参考文献[8],最低可测为 0.1ng/mL;性类固醇激素含量的测定参考文献[9]的方法,最低可测为 25 pg/mL。数据以平均值±标准误表示,两个平均值之间的差异显著性用 Student's t 检验,两个以上平均值之间的差异显著性用 Duncan's 新复极差检验,  $P < 0.05$  认为差异显著,  $P < 0.01$  认为差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 注射 CPE+ HCG 对鳊性腺发育成熟的影响

两批实验共注射雄鳊 36 尾,注射 CPE+ HCG 5~6 次后,精巢 GSI 大于 4.0% 的有 30 尾,占实验鱼数的 83.33%,对照组鱼 GSI 均在 0.3%~0.8% 之间。两批实验共注射雌性鳊 63 尾,注射 CPE+ HCG 9~10 次后,有 64.39% 的实验鱼 GSI 达到 30% 以上,最大 GSI 为 52.53%,对照组鱼的 GSI 小于 5.0%。表明注射外源促性腺激素能较好地诱导雌雄鳊性腺发育成熟。

### 2.2 注射 CPE+ HCG 对鳊脑区 GnRH 含量的影响

表 1 为注射 CPE+ HCG 诱导雄鳊成熟过程中脑区 GnRH 含量的变化。注射前脑区各部分和总 mGnRH 及 cGnRH- II 的含量都很低,A、B、C 各部分的含量没有显著差异。注射 4 次后,脑区总 mGnRH 含量比注射前增加 2.1 倍,其中主要是 B 部分的增加。注射 5 次后脑区总 mGnRH 含量达到(1178.27±144.16) pg, A 部分和 B 部分都比注射 4 次后显著增加( $P < 0.01$ ), C 部分 mGnRH 含量在注射过程中较低。脑区总 cGnRH- II 在注射前为(86.59±20.09) pg。注射 4 次和 5 次后分别增加到(298.15±72.76)和(317.68±68.23) pg,其中主要是 B 和 C 部分的增加。表明注射 CPE+ HCG 能促使雄鳊脑前区(A 和 B) mGnRH 和脑后区(B 和 C) cGnRH- II 的含量增加。

表 1 注射 CPE+ HCG 诱导雄鳊成熟过程中脑区 GnRH 含量的变化

Tab.1 The variation of GnRH contents in dissection brain of male Japanese eel induced by injection of CPE+ HCG

取样时间	激素类型	脑部分区			脑区总含量
		A	B	C	
注射前	mGnRH	50.03±6.97	74.10±16.25	44.63±10.47	168.76±33.51
	cGnRH- II	< 20	29.35±11.51	57.24±8.58	86.59±20.09
注射 4 次后	mGnRH	91.31±32.04	264.85±70.34	< 20	351.16±102.38
	cGnRH- II	44.30±15.41	110.20±26.92	143.65±30.43	298.15±72.76
注射 5 次后	mGnRH	372.49±65.53	805.78±78.63	< 20	1178.27±144.16
	cGnRH- II	69.26±17.68	128.89±33.24	19.53±17.311	317.68±68.23

注:平均值±标准误(pg/脑组织),n=8。

表 2 表示注射 CPE+ HCG 后诱导雌鳊成熟过程中脑区 GnRH 含量的变化。在注射前,脑区总 mGnRH 含量为(418.38±64.78) pg,是雄鳊的 2.48 倍,而且主要分布在 A 和 B 部分。注射 CPE+ HCG 6 次后,mGnRH 总含量增加到注射前的 1.6 倍,其中 A 和 B 部分显著高于 C 部分( $P < 0.05$ )。注射 10 次后 mGnRH 含量继续升高,脑区总含量达到注射前的 2.1 倍,A 和 B 部分均比注射 6 次时显著升高( $P < 0.01$ ),C 部分含量无显著变化( $P > 0.05$ )。脑区总 cGnRH- II 含量在注射前为(378.22±69.5) pg,是雄鳊的 4.37 倍。在注射 CPE+ HCG 诱导卵巢发育过程中呈减少的趋势。表明注射 CPE+ HCG 可增加雌

鳊脑前区(A和B)mGnRH的含量,而对cGnRH- II的含量无显著影响。

表2 注射CPE+ HCG诱导雌鳊成熟过程中脑区GnRH含量的变化

Tab. 2 The variation of GnRH contents in dissection brain of female Japanese eel induced by injection of CPE+ HCG

取样时间	激素类型	脑部分区			脑区总含量
		A	B	C	
注射前	mGnRH	159.67 ± 35.95	258.71 ± 28.83	< 20	418.38 ± 64.78
		57.28 ± 18.92	147.99 ± 13.39	172.95 ± 37.19	378.22 ± 9.5
注射4次后	mGnRH	249.42 ± 42.16	362.81 ± 36.40	56.29 ± 9.80	668.52 ± 88.36
	cGnRH- II	28.19 ± 9.26	89.46 ± 15.14	112.44 ± 20.06	230.09 ± 4.46
注射5次后	mGnRH	372.49 ± 65.53	709.32 ± 143.16	87.73 ± 4.04	1170.62 ± 186.32
	cGnRH- II	69.26 ± 17.68	84.47 ± 18.26	97.33 ± 13.04	209.47 ± 41.96

注:平均值±标准误(pg/脑组织), n= 8。

### 2.3 注射CPE+ HCG对鳊血清GtH含量的影响

雄鳊血清GtH含量在每次注射CPE+ HCG后1天均大于100 ng/mL。10天后下降至20~ 80 ng/mL。对照组雄鳊血清GtH含量在整个实验过程中为0.5~ 1.0 ng/mL之间。

对照组雌鳊血清GtH含量在整个实验过程中无显著变化(1.0~ 2.0 ng/mL)。实验组雌鳊每次注射CPE+ HCG后1天血清GtH急剧上升(30~ 70 ng/mL),注射4、5、6次10天后下降,与相应对照组无显著差异(P> 0.05),注射7和8次后10天血清GtH水平则仍然高于相应对照组(图1)。可见,外源促性腺激素注入雌雄鳊体内后,能立即引起血清GtH含量的大幅度上升。

注射CPE+ HCG 8次后雌鳊血清GtH的动态变化为:注射1天后显著上升,之后逐渐下降,至第10天时下降至与注射前无显著差异(P> 0.01)(图2)。

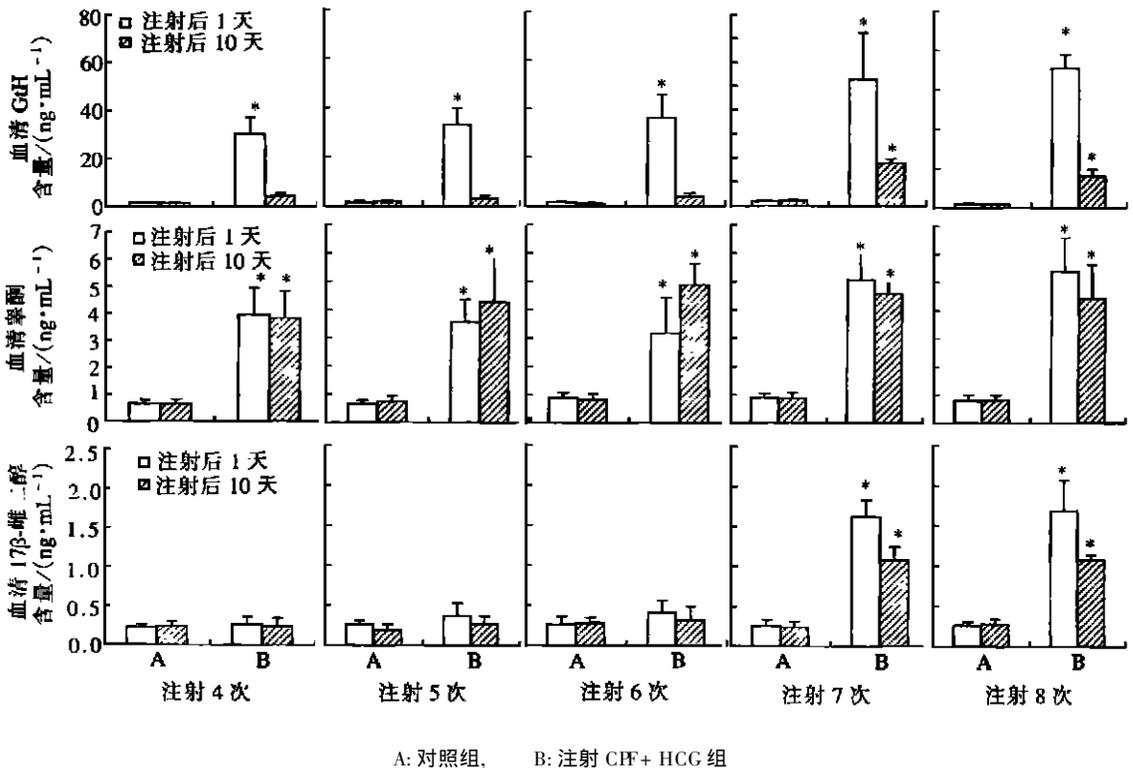


图1 注射CPE+ HCG后雌鳊血清激素含量变化

Fig. 1 The variation of serum hormone profiles of female Japanese eel after injection of CPE+ HCG

注:显著高于相应的对照组(P< 0.05)

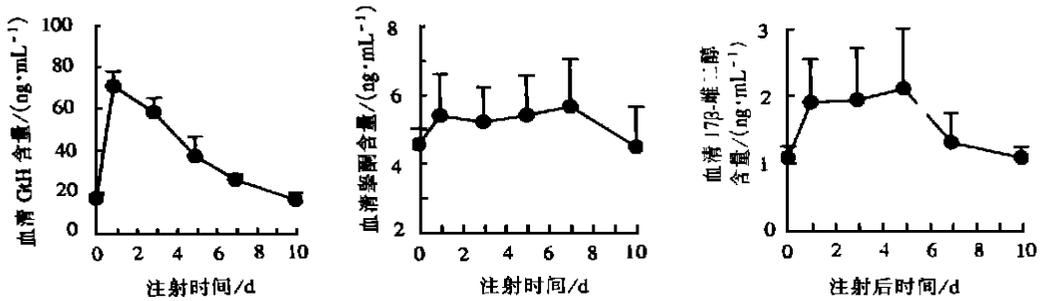


图2 注射 CPE+ HCG 8 次后雌鳊血清激素含量的动态变化

Fig. 2 The dynamic variation of serum hormone profiles of female Japanese eel after 8 injections CPE+ HCG

## 2.4 注射 CPE+ HCG 对鳊血清性类固醇激素的影响

雄鳊注射 CPE+ HCG 1~ 4 次后血清睾酮浓度均低于 70 pg/mL, 与对照组相同。注射 5 次后 1 天血清睾酮浓度为 (1.67 ± 0.44) ng/mL。10 天后下降为 (1.11 ± 0.75) ng/mL。

雌鳊注射 CPE+ HCG 4~ 8 次后 1 天和 10 天血清睾酮的浓度均显著高于相应对照组 (0.6~ 0.8 ng/mL) ( $P < 0.01$ ) (图 1)。表明注射 CPE+ HCG 后雌鳊血清睾酮浓度一直维持在较高且稳定的水平。

对照组雌鳊血清 17β-E<sub>2</sub> 浓度为 0.2~ 0.3 ng/mL。实验组雌鳊注射 CPE+ HCG 4~ 6 次后 1 天和 10 天血清 17β-E<sub>2</sub> 水平与对照组均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。注射 7 次和 8 次后 1 天, 血清 17β-E<sub>2</sub> 含量水平分别达到 (1.62 ± 0.21) ng/mL 和 (1.69 ± 0.38) ng/mL, 显著高于对照组和其他各次 ( $P < 0.01$ ), 10 天后分别下降至 (1.08 ± 0.17) ng/mL 和 (1.08 ± 0.06) ng/mL。但仍高于对照组 ( $P < 0.05$ ) (图 1)。

注射 CPE+ HCG 8 次后雌鳊血清睾酮和 17β-E<sub>2</sub> 的动态变化为: 注射时血清睾酮和 17β-E<sub>2</sub> 的浓度分别为 4.55 和 1.08 ng/mL。注射后血清睾酮浓度在 1~ 7 天内略有上升 (5.20~ 5.64 ng/mL), 10 天后有所下降 (4.45 ng/mL), 但均无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 血清 17β-E<sub>2</sub> 在注射后 1 天显著上升到 1.69 ng/mL ( $P < 0.01$ ), 3 天和 5 天均保持在较高水平 (1.94 和 2.11 ng/mL), 7 天时下降为 1.30 ng/mL, 与注射时无显著差异 ( $P > 0.05$ ) (图 2)。

## 3 讨论

### 3.1 注射 CPE+ HCG 诱导鳊性腺发育成熟的效果

注射 CPE+ HCG 5~ 6 次后, 有 83.33% 的雄鳊 GSI 可达到 4.0% 以上, 表明这种方法诱导鳊精巢发育成熟具有良好的效果。在欧洲鳊和日本鳊, 单独注射 HCG 就可诱导雄鳊精巢发育成熟<sup>[10, 11]</sup>。雌鳊注射 CPE+ HCG 9~ 10 次后, 有 63.49% 的实验鱼 GSI 可达到 30% 以上, 最大 GSI 超过 50%, 表明注射外源促性腺激素能有效地诱导雌鳊卵巢发育成熟。

关于注射鱼类脑垂体诱导鳊性腺发育成熟过程中所使用的种类和剂量, 各学者有所不同, 欧洲学者注射鲤鱼脑垂体, 剂量为 2 mg/100 g B.W, 间隔 2~ 3 天注射, 约 39 次 (90 天) 后部分雌鳊卵巢发育达到成熟。日本学者注射鲑鱼脑垂体, 剂量为 20 μg/g B.W, 间隔 7 天注射, 约 15 次后卵巢可达成熟<sup>[2, 4]</sup>。我们采用鲤鱼脑垂体和 HCG 混合注射, 与王义强等使用的剂量相似<sup>[1]</sup>。从催熟效果来看, 都可诱导鳊卵巢发育成熟。因此, 催熟剂的用量可能不是影响鳊卵巢发育的重要因素。

### 3.2 关于注射外源 GnRH 诱导鳗鲡性腺发育的机理

注射鱼类脑垂体匀浆液和 HCG 诱导鳗鲡性腺发育的机理的研究报道还较少。本实验注射 CPE+HCG 后,脑区 mRnRH 的含量随注射次数的增加而增加,与欧洲鳗鲡的实验结果一致<sup>[7]</sup>,进一步证明了 mGnRH 是调节鳗鲡生殖活动的主要 GnRH 种类;同时也说明注射外源促性腺激素可以通过影响鳗鲡脑区 mGnRH 的合成进而刺激脑垂体 GnRH 的合成来刺激性腺发育。雌鳗在注射 CPE+HCG 后,血清睾酮浓度增加,睾酮可在脑和脑垂体水平通过正反馈作用刺激 mGnRH 的合成以及脑垂体 GnRH 的合成。在性未成熟虹鳟,埋植或注射睾酮都能刺激 GnRH 和 GnRH 的合成和释放<sup>[12]</sup>。在注射 7 次后 10 天血清 GnRH 仍在较高水平,可能与鳗鲡内源 GnRH 的合成和释放有关。雄鳗注射 CPE+HCG 后,血清睾酮浓度没有升高,可能睾酮被转化成其它性类固醇激素,如 11-酮基睾酮再通过它起正反馈作用来刺激 GnRH 和 GnRH 的合成和释放。注射 CPE+HCG 后雌雄鳗鲡脑区 GnRH 含量的不同变化形式可能反应了雌雄鳗鲡脑区 GnRH 的不同分布。

雄鳗精巢的发育成熟是在 GnRH 的作用下完成的。诱导鳗鲡内源的 GnRH 产生后,精巢可以发育成熟。在切除脑垂体的欧洲雄鳗,注射 HCG 同样可以诱导精巢发育成熟,表明雄鳗外源 GnRH 与内源 GnRH 在诱导精巢发育成熟时具有相同的生理作用。但在雌鳗,单独注射 HCG 对卵巢发育毫无影响<sup>[3]</sup>。表明在雌雄鳗鲡,性腺 GnRH 受体的种类、结构、亲和性等都可能存在很大差异。

外源促性腺激素进入鳗鲡体内后的变化及其作用方式仍然不清楚。本实验结果表明,注射 CPE+HCG 后鳗鲡血清 GnRH 在注射后 1 天急剧升高,然后下降,再次注射后又是急剧上升。一般来说,鱼类性腺发育是 GnRH 缓慢而稳定增加的结果,鳗鲡 GnRH 幅度较大的起落变化对鳗鲡性腺发育是否会产生重大影响还有待进一步实验证明。血清睾酮浓度的增加,表明外源促性腺激素刺激了睾酮生成,但雌鳗注射 CPE+HCG 1~6 次后,血清  $17\beta$ - $E_2$  的含量一直没有增加。离体研究也表明,即使以高浓度的睾酮为底物,再加入 HCG 150~450 $\mu$ m 的离体卵母细胞生成  $17\beta$ - $E_2$  的能力仍然很低<sup>[4]</sup>。说明在此期间鳗鲡卵巢缺乏将睾酮转变为  $17\beta$ - $E_2$  的芳化酶活性。在硬骨鱼类,卵巢芳化酶是在 GnRH 的作用下合成的,因此,外源促性腺激素可能对芳化酶的活性影响不大,注射 7 次后血清  $17\beta$ - $E_2$  含量的增加可能与内源 GnRH 的释放有关。然而,即使血清  $17\beta$ - $E_2$  的含量在注射 1~6 次期间一直较低(与对照组无显著差异),卵巢却在不断地积累卵黄物质。我们可能未检测到  $17\beta$ - $E_2$  的分泌高峰。外源促性腺激素进入鱼体后,由于受卵细胞上的受体类型、数量和亲和性等的影响,有可能在激素与受体结合后的转录或翻译过程产生变异,当然,此有待于进一步的研究来检验。另外,鱼类脑垂体匀浆液中含有多种激素,各种激素的作用很难区分。由于在大多数硬骨鱼类存在两种促性腺激素(GnRH-I 和 GnRH-II),在鲑科鱼类的不同性腺发育时期,两种 GnRH 生理功能分化较为明显<sup>[13]</sup>。最近,Yoshiura 证明在鳗鲡同样存在两种 GnRH,但它们各自在性腺不同发育阶段的生理功能仍不清楚<sup>[14]</sup>。在欧洲鳗鲡注射纯化的鲤鱼 GnRH-II 可以促进性腺发育<sup>[3]</sup>,这方面的工作仍有待于更深入的研究。脑垂体匀浆液中其它种类的激素,如生长激素、促乳素、促甲状腺激素、促肾上腺皮质激素等对亲鳗的物质代谢和卵巢发育所产生的影响也值得进一步研究。

### 参 考 文 献

- 1 王义强,赵长春,施正峰等. 河鳗人工繁殖的初步研究. 水产学报, 1980, 4(2): 147~156
- 2 Ohta H, Kagawa H, Tanaka H, et al. Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by  $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquac, 1996, 139(2): 291~301
- 3 Fontaine Y A, Dufour S. The eels: from life cycle to reproductive endocrinology. Bull Inst Zool Academia Sinica Monograph, 1991, 16: 237~248
- 4 Ijiri S, Kazeto Y, Takeka N, et al. Changes in serum steroid hormones and steroidogenic ability of ovarian follicles during artificial maturation of cultivated Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquac, 1995, 135(1): 3~16
- 5 Dufour S, Pasqualini C, Kerdelhue B, et al. Presence and distribution of radioimmunoassayable LHRH in the European eel, *Anguilla anguilla*.

- Neuropeptides, 1982, 3: 159~ 171
- 6 Yu K L, Nahomik C S, Peter R E, et al. Brain distribution of radioimmunoassayable gonadotropin-releasing hormone in female goldfish: seasonal variation and periovulatory changes. *Gen Comp Endocrinol*, 1987, 51(2): 234~ 246
  - 7 Dufour S, Montero M, Le B 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*. *Fish Physiol Biochem*, 1993, 11(1): 99~ 106
  - 8 林浩然, 张梅丽, 张素敏等. 鳊繁殖生物学研究 IV. 人工催熟过程中下海鳊的 GnRH 分泌活动、性腺发育状况和脑垂体 GnRH 细胞的超显微结构. *水生生物学报*, 1987, 11(3): 320~ 328
  - 9 Van D K G, Dye H M, Donaldson E M. Effects of LHRH and Dey-Gly<sup>10</sup> (D-ALA<sup>6</sup>) LHRH-ethylamine on plasma sex steroid profiles in adult female coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen Comp Endocrinol*, 1984, 85(2): 217~ 229
  - 10 Khan I A, Lopez E, Leloup H. Induction of spermiation by single injection of human chorionic gonadotropin in intact and hypophysectomized immature European eel (*Anguilla anguilla* L). *Gen Comp Endocrinol*, 1987, 68(1): 91~ 103
  - 11 Miura T, Yamauchi K, Nagahama Y, et al. Induction of spermatogenesis in male Japanese eel, *Anguilla japonica*, by single injection of human chorionic gonadotropin. *Zool Sci*, 1991, 8(1): 63~ 73
  - 12 Grim L W, Evans D M. Influence of testosterone and / or luteinizing hormone-releasing hormone analogue on precocious sexual development in the juvenile rainbow trout. *Biol Reprod*, 1983, 29(1): 137~ 142
  - 13 Pharas J V, Athos J, Swanson P. Regulation of ovarian steroidogenesis *in vitro* by gonadotropins during sexual maturation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). In: Goetz F W, Thomas P, eds. *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. 1995, 296~ 298
  - 14 Yoshiura Y, Suetake H, Aida K. Duality of gonadotropin in a primitive teleost, Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Gen Comp Endocrinol*, 1999, 114(1): 121~ 131