

外源性促性腺激素诱导日本鳗鲡卵子发生和卵巢发育成熟的机制

宋海霞¹, 方琼珊², 翁幼竹¹, 王涵生², 方永强^{1*}

(1. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005;

2. 福建省水产研究所, 福建 厦门 361012)

摘要: 用兔抗促黄体素生成素受体(LHR)或称绒毛膜促性腺激素受体(CGR)、雌激素受体(ER)和孕激素受体(PR)的抗体对LHR, ER和PR进行免疫组织化学定位。目的在于揭示外源性促性腺激素(鲤鱼脑垂体提取物, CPE和人绒毛膜促性腺激素, hCG)诱发日本鳗鲡卵子发生和卵母细胞成熟的内分泌机制。结果表明, 注射激素前后卵巢发育和卵子发生出现了十分显著的变化。卵巢组织学切片观察显示激素处理前鳗鲡卵巢发育处于卵黄发生早期, 卵母细胞平均直径(220 ± 0.01) μm 。第一次注射这两种激素后10 d, 实验组卵母细胞中卵黄核分散在核的周围, 核仁数量显著增加, 多达18~20个左右, 而对照组8~10个。第3和4次激素处理后, 卵母细胞发育进入卵黄发生早-中期至中期, 卵黄颗粒数量增加。第6和7次激素处理后, 卵母细胞进入卵黄发生中后期到成熟期, 卵母细胞胞质中充满卵黄颗粒, 胞径和核径增加, 分别为(570 ± 1.39) μm 和(128 ± 1.19) μm , 而对照组没有变化。其次, 免疫组织化学染色结果显示LHR、ER和PR均定位在鳗鲡卵巢中卵母细胞胞质、核膜、核质、卵被膜和体细胞上。这里值得指出的是, 从第3次和第4次激素处理后, 这三种受体的定位各有特点, LHR免疫活性主要定位在卵黄发生中期至中后期卵母细胞的体细胞(卵被膜内层为滤泡细胞和外层为膜细胞)的胞质, 显示强的免疫阳性反应, 而ER和PR则定位在卵母细胞的核内。这些结果首次揭示了外源激素(LH、FSH和hCG)诱导雌鳗卵母细胞发育和成熟的内分泌机制: 首先, LH和hCG与体细胞膜上的LH受体结合, 刺激其合成和分泌 E_2 , 接着 E_2 与卵母细胞ER核受体结合, 激发卵黄发生期卵母细胞生长发育和合成卵黄颗粒。另外, PR可能介导 17α -羟基孕酮在卵母细胞的基因效应使之最后成熟。本研究提供确凿的形态学证据。

关键词: 日本鳗鲡; 促性腺激素; LH或CG受体; 卵子发生; 免疫组织化学

中图分类号: Q 954.4; S 917

文献标识码: A

国内外学者应用外源性促性腺激素(鲤鱼或鲑鱼脑垂体激素, CPH或SPH和人绒毛膜促性腺激素, hCG), 成功地诱导雌鳗性腺发育和成熟^[1-3], 这种诱导作用的机制, 许多研究者都是根据鳗鲡生殖内分泌调控轴(脑、腺垂体和性腺)各部分对外源性促激素的应答所出现的细胞形态结构和不同激素水平的变化, 来分析它们的内分泌机制。如在脑和垂体水平上, 汪小东等^[4]观察到注射CPE+HCG可显著增加鳗鲡端脑、间脑、中脑和下丘脑mGnRH的含量, 用放免测定法还发

现雌雄鳗鲡每次注射CPE+HCG后1 d, 血清促性腺激素(GtH)急剧上升, 10 d后逐渐下降^[4]。林浩然等^[5]用电镜观察发现在激素诱导性腺发育成熟过程中雌鳗脑垂体GtH细胞超显微结构处于活跃的合成与分泌状态。Jeng等^[6]用鲑鱼脑垂体匀浆慢性处理雌鳗性腺成熟, 发现SPH刺激鳗鲡垂体LH- β 的转录, 但对FSH- β 则抑制。这一结果被Ozaki等^[7]用免疫组织化学方法所证实。在性腺水平上, 林浩然等^[8]发现了CPE和hCG诱导雌鳗性腺发育的机制是这两种激素直

收稿日期:2009-09-15

修回日期:2010-04-12

资助项目:农业部公益性研究项目(nyhyzx07-043-16-02)

通讯作者:方永强, Tel:0592-2195277, E-mail: fant98@public.xm.fj.cn

接作用于靶细胞卵母细胞的滤泡膜,刺激类固醇激素(主要是雌二醇)生成而促进卵母细胞发育成熟。Kamei等^[9]和 Matsubara等^[10]也分别发现FSH和hCG刺激鳊卵母细胞直径和 17β -雌二醇(E_2)分泌之间呈现正的相关性,以及血清 E_2 和睾酮(T)水平在SPH注射后上升和在核移位(MN)时期达到高峰^[11]。Kayaba等^[12]还观察到重复注射SPH诱导日本鳊卵巢发育和卵母细胞胞质中油滴与细胞器的形态变化,尤其是与线粒体的密切关系。此外,柳凌等^[13]和 Dou等^[14]报道外源激素和环境因子(温度等)对鳊卵巢发育成熟和产卵性能的影响。然而,上述学者均未回答这两种促激素是如何刺激卵巢体细胞合成和分泌类固醇激素,诱导鳊卵巢成熟,而有关这方面的研究,新近仅见方琼珊等^[15]报道了CPH和hCG诱导雄鳊性腺发育和成熟的机制是通过其相应受体激活精巢体细胞产生类固醇激素所致,而在雌鳊卵巢发育成熟的机制是通过哪些途径,是否也是通过其相应受体的介导,迄今仍不了解。所以,本文就这两种激素一起注射到雌鳊后如何诱发卵巢成熟的机制进行研究,目的是为雌鳊的人工繁殖和鱼类生殖内分泌学积累基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

2009年1月从广东省番禺水域收购入海亲鳊,从中选取体质良好雌鳊24尾,个体适中雌鳊(体长52.0~64.5 cm,体重217~495 g)被运到福建省诏安县大华水产有限公司鳊养殖池;入室内养殖池后,水温逐渐升至23℃左右,盐度32~35。适应环境后,开始进行注射激素实验。

1.2 方法

样品制备 实验组于2009年1月24日开始注射外源性激素,鲤鱼脑垂体提取物和人绒毛膜促性腺激素,剂量分别是雌鱼0.4 mg和50 I.U./尾,每周注射一次,持续7次。注射前随机取未注射雌鳊为对照组。每次取材鳊都是先用丁香酚麻醉后,再测量体长和称体重,接着解剖取出对照组和实验组的卵巢,称重,用卵巢重量/体重 $\times 100\%$,计算成熟系数。同时,在同一部位各取12小块卵巢组织,立即分别放入 Bouin-Hollande 氏液和新配制不含醋酸的 Bouin 氏液中

固定12~16 h,系列酒精脱水,paraplast包埋。卵巢组织学切片厚5~6 μm ,苏木精-伊红染色,用于判断注射前雌鳊卵巢发育的时期和注射激素后卵巢发育和卵子发生的组织学变化。用于免疫组织化学切片厚5~6 μm ,裱贴在预先涂有多聚赖氨酸的载玻片上,观察注射激素前后的对照组和实验组卵巢中LH(hCG)受体、雌激素受体(ER)和孕激素受体(PR)的敏感性及其反应强度的变化,用以揭示激素诱导卵母细胞发育成熟的作用机制。首次注射后每1~2周取材一次,一直持续到外观可见雌鳊腹部显著的膨胀和松软这一卵巢成熟的标志出现为止。

免疫组织化学反应 切片经脱蜡水化后,放入3% H_2O_2 中10 min,以阻断内源性过氧化物酶活性。蒸馏水轻洗3次后,在0.01 mol/L PBS(pH 7.2~7.4)中浸泡5 min,然后滴加1:10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,分别是兔抗绒毛膜促性腺激素受体抗体(CGR)或称LHR(购自武汉博士德生物工程有限公司,免疫组织化学专用产品,抗体特异性该公司已检测,1:100稀释)和雌激素和孕激素受体的多克隆抗体(1:250、1:150),4℃孵育24~36 h。PBS轻洗后,每张切片滴加聚合物增强剂,室温下孵育20 min。滴加酶标抗兔聚合物(购自福州迈新生物技术开发公司),室温下孵育30 min,PBS轻洗3次,最后用3',3'-二氨基联苯胺(DAB)显色3~5 min。对照实验片采用PBS、正常兔血清替代第一抗体进行同步孵育。

2 结果

2.1 河鳊入海前的卵巢发育及注射激素后的变化

河鳊入海前的卵巢发育特点 下海雌鳊卵巢为叶片状,灰白色,每个瓣状叶片清晰可见,位于腹腔背面,肾脏两侧,表面无结缔组织被膜包裹,无卵巢腔,属裸状卵巢。与其它硬骨鱼类卵巢的不同在于,日本鳊卵巢特别长,从卵巢前端至泄殖孔一直延伸至末端,为便于测定,将一端-泄殖孔这段称为前卵巢,有11.5~18 cm,从泄殖孔之后至末端,称为后卵巢,有9.0~17 cm,不同大小雌鳊其前后卵巢的长度不同。另外,对照组雌鳊卵巢成熟系数为3.14%。卵巢切片观察结果

显示,卵母细胞细胞学特点是细胞形态为卵圆形或椭圆形,核居中或偏于一侧,核质被伊红染为浅红色,核的一端可见卵黄核,被染为紫红色。核仁靠近核内膜,还有个别核仁正外溢。胞质的特点是胞质中央布满脂肪泡,泡的大小不一,为7~11.2 μm 。另一特点是嗜碱性网状带移到胞质周围,网状带变粗,有的凝聚为块状,分布在胞质边缘或靠近卵被膜。同时在高倍显微镜下,还可见多数卵母细胞在卵被膜下方有2~3行细的卵黄粒,被染为红色,而少数细胞则否,从而证明未经激素注射的雌鳗卵巢发育已进入卵黄发生时期的早期时相(图版 I-1,2)。卵母细胞平均胞径(220 \pm 0.01) μm ,核径(68 \pm 0.011) μm 。

激素处理后的变化 实验组雌鳗第一次注射 hCG 和 CPE(简称为激素)后 10 d,卵巢为乳白色,成熟系数为 3.63%。卵巢切片观察结果显示,卵母细胞发育与对照组不同在于:卵黄核分散在核的周围,核仁的数量显著的增加,多达 18~20 个(图版 I-3)。卵母细胞胞径(240 \pm 0.09) μm ,核径(68 \pm 0.012) μm 。第二次注射后 8 d,卵巢成熟系数增加为 4.93%,卵母细胞出现两个主要的变化,一是在卵母细胞胞径和核径增加,分别为(260 \pm 0.02) μm 和(70 \pm 0.013) μm ;二是可见核仁从核孔向胞质外溢,靠近卵被膜下方卵黄颗粒的数量明显的增多(图版 I-4)。第 3 和第 4 次注射后与上次的差别是:(1) 卵巢成熟系数上升,分别为 7.83% 和 8.53%,卵母细胞胞径和核径也增大,它们均为(280 \pm 0.008) μm 和(74 \pm 0.09) μm ;(2) 卵巢进一步发育,卵母细胞进入卵黄发生早-中期到中期,卵黄颗粒数量明显的增加,且分布在胞质中央(图版 I-5)。第 5 和第 6 次注射后,雌鳗腹部变化是前者腹部略有膨大,而后者腹部显著地膨大,卵巢成熟系数分别为 10.4% 和 18.0%。切片观察卵母细胞的体积增大,胞径与核径分别为(330 \pm 0.018) μm ,核径(95 \pm 0.016) μm ,和(490 \pm 0.05) μm 与(130 \pm 0.01) μm ,胞质中有大量卵黄颗粒,卵母细胞进入卵黄发生中后期(图版 I-6)。同时,从放大的卵被膜上可见两种不同形态的体细胞(非生殖细胞),位于内层为长方形的滤泡颗粒细胞,和外层为扁平形膜细胞(图版 I-7)。第 7 次注射激素后,即第 60 天,雌鳗卵巢发育成熟,外部形态变化是腹部松软膨大,麻醉后解剖观察,肉眼可见卵巢

中卵母细胞处于游离状态,卵巢成熟系数为 34.0%,切片特点是胞质中充满卵黄颗粒,核居中但尚未移位,胞径和核径达到最大值,分别为(570 \pm 1.39) μm 和(138 \pm 1.19) μm (图版 I-8)。往后就不再注射这两种促性腺激素予以催熟,而是在适宜的时间进行催产实验。此时未经激素处理对照组卵母细胞仍处于卵黄发生早期,卵母细胞没有进一步发育。

2.2 激素诱导日本鳗鲡卵巢发育成熟的作用机制

免疫组织化学染色结果显示,LHR、ER 和 PR 免疫活性定位在不同发育时期卵巢中卵母细胞的卵被膜、核膜、核质和体细胞上,呈现免疫阳性,而对照片则显示免疫阴性。

LHR 在雌鳗卵巢中的定位 免疫染色结果显示,未注射激素对照组雌鳗卵巢中仅有少数卵母细胞的卵被膜,胞质和核膜对 LHR 显示很弱免疫阳性(图版 II-1),大多数卵母细胞则为免疫阴性。第 1 次注射激素后 10 d,卵母细胞胞质和核膜均对 LHR 抗体免疫阳性反应有所增强,而脂肪泡和核质则显免疫阴性(图版 II-2)。第 2 次注射激素后,LHR 的免疫强度有所增强。特别是,第 3 次和第 4 次注射后,LHR 免疫活性的定位有显著的变化,卵巢中除小生长期卵母细胞胞质仍对 LHR 抗体显示免疫阳性外,卵黄发生早-中期少数卵母细胞上的体细胞显示强的免疫阳性反应,而胞质和核则显免疫阴性(图版 II-3)。同时,图版 II-3 卵被膜放大可见 LHR 免疫阳性首先定位在卵被膜外层膜细胞的胞质,显强的免疫阳性,而内层滤泡细胞尚未发育成熟(图版 II-4)。第 5 次注射后,多数卵黄发生中期时相的卵母细胞的核质和体细胞对 LHR 抗体显示强的免疫阳性(图版 II-5),对图版 II-5 体细胞放大可见卵被膜上两种体细胞,即内层滤泡细胞和外层膜细胞的胞质均对 LHR 抗体显示强的免疫阳性反应(图版 II-6);第 6 次注射后,卵巢中卵母细胞发育进入卵黄发生的中后期时相,LHR 免疫活性突出的变化是 LHR 免疫阳性定位在核质和体细胞上,免疫强度增强,胞质显免疫阴性(图版 II-7)。第 7 次注射后,雌鳗进入卵巢成熟期,核质和卵被膜免疫阳性显著的减弱(图版 II-8)。

ER 在雌鳗卵巢中的定位 免疫染色结果显示,对照组雌鳗卵巢中卵黄发生早期卵母细胞对 ER 受体发生强的免疫阳性反应,阳性物定位

在核质、卵被膜、卵黄颗粒和脂肪泡膜,脂肪泡显免疫阴性。第1次注射激素后,与对照组差别在于核质、卵被膜、胞质和卵黄颗粒显示更强免疫阳性(图版Ⅲ-1,2),而在第2次注射后卵母细胞对ER抗体显示免疫阳性反应与第1次注射后类似,仅是核质的免疫强度略有减弱。但是,从第3次注射后,卵母细胞开始进入卵黄发生早-中期,其特点是紧贴卵母细胞卵被膜上的体细胞对ER抗体显示强的免疫阳性反应(图版Ⅲ-3),体细胞放大显示内为滤泡颗粒细胞和外为滤泡膜细胞(图版Ⅲ-4),且随着注射次数的增加而增强,表现在注射第5次后两种体细胞免疫强度达到高峰(图版Ⅲ-5,6)。第6和第7次注射后雌鳎卵巢发育从开始进入卵黄发生中后期和成熟期,此时卵母细胞对ER抗体的应答特点是除卵黄发生中期卵母细胞仍保留强的核质免疫阳性外,卵被膜免疫阳性明显地减弱,而核质和胞质变为免疫阴性(图版Ⅲ-7,8)。

PR在雌鳎卵巢中的定位 免疫染色结果显示孕激素核受体(PR)免疫活性定位在对照组雌鳎卵黄发生早期卵母细胞的胞质和卵被膜,生殖卵泡(核)显免疫阴性(图版Ⅳ-1)。第1次注射激素后,PR免疫活性在核膜、胞质和卵被膜显更强的免疫阳性(图版Ⅳ-2)。第2次注射激素后,卵母细胞胞质和卵被膜的免疫强度增强。第3次注射激素后,PR免疫活性除在早期和卵黄发生早期卵母细胞仍保留免疫阳性外,在卵黄发生早-中期生殖卵泡(核)首先对PR抗体显示强的免疫阳性反应,并持续到第4和第5次注射激素后,卵黄发生中期卵母细胞生殖卵泡和卵被膜免疫阳性增强,而胞质和核膜均显免疫阴性(图版Ⅳ-3,4)。图版Ⅳ-4卵被膜放大,可见靠近卵被膜的滤泡细胞对PR抗体显示强的免疫阳性反应(图版Ⅳ-5)。第6次注射激素后,卵巢发育处在卵黄发生中后期,此时PR免疫活性除在早期卵母细胞显免疫阳性外,其余卵黄发生中后期卵母细胞均对PR抗体显示免疫阴性(图版Ⅳ-6)。第7次注射激素后,卵巢成熟期,PR免疫活性定位在卵被膜,显示强的免疫阳性反应,而胞核免疫阳性消失(图版Ⅳ-7)。

3 讨论

一些学者研究揭示注射CPE和hCG诱导雌

鳎卵巢成熟的机制是通过刺激卵巢滤泡细胞产生雌激素(E_2)^[8-10],并没有阐明这两种外源性促性腺激素(FSH、LH和hCG)是通过什么途径使雌鳎卵巢发育成熟。众所周知,FSH和LH在脊椎动物(包括鱼类)生殖中起关键作用,该作用是通过它们的受体刺激睾丸和卵巢功能^[16-17]。然而,有关这两种促激素在卵巢中生殖细胞和体细胞是否存在相应的受体,以及激素刺激卵母细胞发育后它们的受体定位发生什么变化,迄今尚未见可利用资料。本研究结果首次揭示注射CPE和hCG诱导日本鳎卵巢发育成熟的内分泌机制,像雄鳎一样^[15],也是通过其相应受体的介导完成的。

LHR免疫活性定位在对照组雌鳎卵巢中卵黄发生早期卵母细胞核膜和卵被膜上,显示很弱免疫阳性,实验组经注射激素后卵母细胞的胞质和卵被膜免疫强度增强,尤其是在第3次注射激素后卵母细胞直径增加,从240 μm 增长到270 μm ,卵巢处于卵黄发生早-中期时相,此时卵母细胞的卵被膜最外层扁平形膜细胞(flat-shaped theca cells)首先对LHR抗体发生强的免疫阳性反应(图版Ⅱ-4),该反应可看作日本鳎注射脑垂体匀浆和hCG后先使膜细胞发育成熟的一个免疫标记。尔后,第5次注射激素后,卵黄发生中期卵母细胞直径增加为310~330 μm ,两种体细胞(内层为长方形滤泡颗粒细胞和外层膜细胞)完全发育成熟,且对LHR抗体发生更强的免疫阳性反应(图版Ⅱ-6),此情况与Kamei等^[9]报道脑垂体匀浆对鳎卵母细胞体细胞发育成熟的观察相一致,并持续到大生长期中后期时相。直接证据是本课题组应用化学发光微粒免疫测定技术(CMIA)对日本鳎血浆中 17β -雌二醇进行测定,结果显示对照组 E_2 为(180 ± 0.18) pg/mL ,而实验组第4次注射激素后达(325 ± 0.56) pg/mL ,两组之间差异十分显著($P < 0.01$)^①。证实了hCG和垂体匀浆中LH共同激发体细胞产生和分泌 E_2 。接着,滤泡细胞分泌的 E_2 与卵母细胞的核受体结合,促使卵母细胞的发育和卵黄发生,导致卵母细胞从卵黄发生早期发育至中后期就是佐证。

生殖内分泌的研究表明,人胎盘分泌绒毛膜促性腺激素(hCG)的生理作用与脑垂体LH等

① 方永强,等. 外源性激素诱导日本鳎血浆类固醇激素水平的变化.

同,并与 LH 在生殖细胞中共享一个共同的受体,且没有种的特异性^[16,18]。这就可以对 CPE 中 LH 和 HCG 这两种激素始动卵母细胞发育的作用机制概述为:先与卵母细胞上的体细胞中 LH 受体结合,后刺激它们发育成熟和分泌雌激素。那么,注射的脑垂体匀浆中另一主要成分 FSH 在诱发雌鳗卵巢发育成熟中起什么作用? Ozaki 等^[7]用免疫组织化学方法证明日本鳗鲡注射 SPH 后,使受者脑垂体中 FSH 产生减少,认为是 SPH 对其产生抑制作用,提示外源性激素 FSH 可能直接作用于卵巢。后来, Kamei 等^[9]研究证实 FSH 可直接刺激雌鳗卵巢,使卵母细胞直径和 E_2 分泌之间呈现正的相关性。这里,笔者认为脑垂体匀浆中 FSH 也是通过其受体起作用,因为研究证实 FSHR 存在于哺乳类睾丸 Sertoli 细胞和卵巢颗粒细胞,FSH 的作用是通过它的受体完成的^[19-20]。同时,有研究指出功能性 FSH 受体还存在于哺乳类卵母细胞和鱼类生殖细胞,这就提示 FSH 可能直接控制卵母细胞的发育^[21-22]。另外 Kagawa^[23]发现一次性注射 SPE 能显著持续 3 d 增加具有正常卵巢的鳗鲡血清中 E_2 水平。由此可见,FSH、LH 和 hCG 都是通过其相应的受体共同刺激两种体细胞-滤泡颗粒细胞和滤泡膜细胞产生 E_2 提供可靠地实验证据。另外,笔者还认为此时 E_2 有两个生理作用:一是刺激卵母细胞发育,使细胞直径增加和诱导肝脏合成卵黄生成素(VTG)^[24-25],刺激卵母细胞的卵黄发生,本研究所见日本雌鳗第 2 次注射激素后卵黄颗粒数量的增加(图版 I-4)就是例证;二是雌激素还通过正反馈刺激脑垂体合成 LH。 E_2 通过长反馈对垂体 LH- β mRNA 的刺激效应,导致脑垂体分泌 LH 再次激发卵巢中 20 β -羟基类固醇脱氢酶(20 β -HSD)的转录并刺激 17 β ,20 α -双羟孕酮的生成,最终促进了卵母细胞的成熟^[25-27],说明 E_2 在促使雌鳗卵母细胞的成熟中起着重要的生理作用。另外, E_2 的作用也是通过其受体介导,早在 1996 年 Todo 等^[28]用分子生物学技术克隆了日本鳗鲡雌激素受体 cDNA,它的开放式阅读框为 573 个氨基酸残基,蛋白质分子量约为 63 417,鳗鲡 ER 氨基酸序列显示与其它种类有高度同源性。本研究所见日本鳗鲡卵巢中均存在雌激素核受体,注射激素后随着卵母细胞发育成熟,这种核受体逐渐消失,图版 III-3,7 和 8 就是很好的例证。从而

有力地证明了日本鳗鲡卵母细胞的发育,卵径增加和卵黄颗粒生成都是受 E_2 经其核受体介导雌激素基因效应,才导致雌鳗卵巢发育成熟,这就揭示外源性激素作用机制的第二步是 E_2 刺激卵母细胞发育和卵黄发生。可是,目前尚难以理解的是雌鳗产生 E_2 的体细胞为何也存在 ER,虽然这种存在的生物学意义现在还不清楚,但笔者同意 Jefferson 等^[29]的看法,雌激素在不同靶细胞有选择性作用,因为他们在小鼠卵巢颗粒细胞也发现 ER 受体。

最后,上述 E_2 通过正反馈使鳗鲡腺垂体分泌 LH 刺激体细胞产生孕激素,表现在 PR 定位在雌鳗卵黄发生不同时相的变化,如第 3 和第 5 次注射激素后,PR 定位在卵被膜,图版 II-5 放大证实为滤泡颗粒细胞,以及从图版 IV-3 和图版 IV-4 也可见 PR 定位在卵母细胞生殖胚泡,这些定位变化的意义在于可为研究者所发现的滤泡颗粒细胞层能够将 17 α -羟基孕酮(17 α -P)转化为 17 α ,20 β -P,然后由膜细胞转化为 17 α ,20 β -P-S,最后通过核孕激素受体(nPR)的介导转换为诱导成熟激素(maturation-inducing hormone, MIH)提供新的证据^[30-31],还说明 PR 在介导 17 α -羟基孕酮在卵母细胞的基因效应,在促使卵母细胞的成熟中起着重要的作用,并为 Miura 等^[32]研究指出,孕激素是调节雄性和雌性脊椎动物性腺最后成熟重要的类固醇激素提供新的证据。

此外,本研究还认为两种外源性促性腺激素诱导日本鳗鲡卵巢发育成熟的内分泌机制十分复杂。本研究分析激素靶器官卵巢中各种受体的定位变化仅是从一个侧面来揭示其内分泌机制,但要真正明了外源性促性腺激素诱导日本鳗鲡卵巢和卵母细胞发育成熟的完整机制还必须了解激素对在体鳗鲡生殖内分泌调控轴的各种影响^[33]与雌鳗卵巢发育成熟的关系,也许更能够较全面揭示其内分泌机制。

参考文献:

- [1] Lin H R, Xie G, Zhang L H, et al. Artificial induction of gonadal maturation and ovulation in the Japanese eel [J]. Bull Fr Peche Piscic, 1998, 349: 163-176.
- [2] Tanaka H, Ohta H, Kagawa H. Development of techniques for artificial induction of maturation and rearing larvae of Japanese eel [J]. Bull Jap Soc Fish,

- 2000,66:623-626.
- [3] 张洁明,柳凌,郭峰,等.人工诱导日本鳎性腺发育组织学研究[J].中国水产科学,2007,14(4):593-602.
- [4] 汪小东,林浩然,谢刚.鲤脑垂体匀浆液和人绒毛膜促性腺激素混合注射对鳎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[J].水产学报,2000,24(2):123-129.
- [5] 林浩然,张梅丽,张素敏,等.鳎繁殖生物学的研究IV:人工催熟过程中下海鳎的GtH分泌活动、性腺发育状况和脑垂体GtH细胞的超显微结构[J].水生生物学报,1987,11(4):320-328.
- [6] Jeng S R, Yueh W S, Chen G R, *et al.* Differential expression and regulation of gonadotropins and their receptors in the Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. Gen Comp Endocrinol, 2007, 154: 161-173.
- [7] Ozaki Y, Ishida K, Saito K, *et al.* Immunohistochemical changes in production of pituitary hormones during artificial maturation of female Japanese eel *Anguilla japonica* [J]. Fisheries Science, 2007, 73: 574-584.
- [8] 林浩然,谢刚,张利红,等.激素诱导鳎性腺发育成熟和排卵的作用机理.中国动物学会编,中国动物科学研究[M].北京:中国林业出版社,1999.
- [9] Kamei H, Kaneko T, Aida K. Steroidogenic activities of follicle-stimulating hormone in the ovary of Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. General and Comparative Endocrinology, 2006, 146: 83-90.
- [10] Matsubara H, Kazeto Y, Ijiri S, *et al.* maturation of Japanese eel *Anguilla japonica* [J]. Fisheries Science, 2003, 69: 979-988.
- [11] Matsubara H, Lokman P M, Kazeto Y, *et al.* Serum steroid profiles in artificially maturing female Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. Aquaculture, 2005, 243: 393-402.
- [12] Kayaba T, Takeda N, Adachi S, *et al.* Ultrastructure of the oocytes of the Japanese eel *Anguilla japonica* during artificially induced sexual maturation [J]. Fisheries Science, 2001, 67: 870-879.
- [13] 柳凌,郭峰.外源激素及环境因子对日本鳎卵巢发育的影响[J].上海水产大学学报,2003,12(1):6-11.
- [14] Dou S Z, Yamada Y, Okamura A, *et al.* Temperature influence on the spawning performance of artificially-matured Japanese eel, *Anguilla japonica*, in captivity [J]. Environmental Biology of Fishes, 2008, 82: 151-164.
- [15] 方琼珊,翁幼竹,刘志刚,等.外源性促性腺激素诱导日本鳎精子发生和成熟的作用机制[J].水产学报,2009,33(4):572-580.
- [16] Ziecik A J, Derecka K, Gawronska B, *et al.* Nongonadal LH/hCG receptors in pig: functional importance and parallels to human [J]. Seminars in Reproductive Medicine, 2001, 19: 19-30.
- [17] Hiroyasu K, Toyoji K, Katsumi A. Steroidogenic activities of follicle-stimulating hormone in the ovary of Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. General and Comparative Endocrinology, 2006, 146: 83-90.
- [18] Rao C V. An overview of the past, present, and future of nongonadal LH/hCG actions in reproductive biology and medicine [J]. Seminars in Reproductive Medicine, 2001, 19: 7-17.
- [19] Griswold M D, Heckert L, Linder C. The molecular biology of the FSH receptor [J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1995, 53: 215-218.
- [20] Hermann B P, Heckert L L. Transcriptional regulation of the FSH receptor: New perspectives [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2007, 260: 100-108.
- [21] Meduri G, Charnaux N, Driancourt M A, *et al.* Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes? [J]. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2002, 87: 2266-2276.
- [22] Sambroni E, Lareyre J J, Breton B. Rainbow trout FSHR is highly polymorph and is differently expressed throughout gametogenesis [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2003, 28: 361.
- [23] Kagawa H. Estimation of gonadal status of Japanese female eel *Anguilla japonica* by a single injection of salmon pituitary extract [J]. Fisheries Science, 2005, 71: 1084-1090.
- [24] Kumagai A, Hayashi S. Participation of high-density lipoprotein in vitellogenesis in Japanese eel hepatocytes [J]. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology, 2005, 140: 543-550.
- [25] Nagahama Y. Endocrine regulation of gametogenesis in fish [J]. Int Dev Biol, 2004, 38: 217-219.
- [26] Nagahama Y. 17-alpha, 20beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action [J]. Steroids, 1997, 62: 190-196.
- [27] Senthikumar B, Yoshikuni M, Nagahama Y. A shift in steroidogenesis occurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation [J]. Mol Cell Endocrinol,

- 2004,215:11-18.
- [28] Todo T, Adachi S, Yamauchi K. Molecular cloning and characterization of Japanese eel estrogen receptor cDNA [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1996,119:37-45.
- [29] Jefferson W N, Conse J F, Banks E P, *et al.* Expression of estrogen receptor β is developmentally regulated in reproductive tissue of male and female mice [J]. *Biol Reprod*, 2000,62:310-317.
- [30] Tveiten H, Scott A P. Steroid synthesis in follicular cells and induction of germinal vesicle breakdown in spotted wolffish (*Anarhichas minor*) oocytes [J]. *Fish Physiol Biochem*, 2003,28(3):273-373.
- [31] 汪小东,林浩然. 鳗鲡繁殖生物学的研究: VI. 鳗鲡 $17\alpha, 20\beta$ -双羟孕酮的生成和作用 [J]. *动物学报*, 1999,45(3):317-322.
- [32] Miura T, Higuchi M, Ozaki Y, *et al.* Progesterin is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenic cells of the eel [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006,103:7333-7338.
- [33] Salima A, Karine Ru, Monika S, *et al.* The Gonadoliberein (S)-Gonadotropin (S) Axis in the Eel: Expression and Regulation Under Induced Maturation and Sex Steroid Feedbacks [M]. G. van den Thillart *et al.* (eds.), *Spawning Migration of the European Eel*, 253 Springer Science + Business Media B V, 2009.

Mechanism of exogenous-gonadotropins-induced oogenesis and ovarian maturation of Japanese eel, *Anguilla japonica*

SONG Hai-xia¹, FANG Qiong-shan², WENG You-zhu¹, WANG Han-sheng², FANG Yong-qiang^{1*}

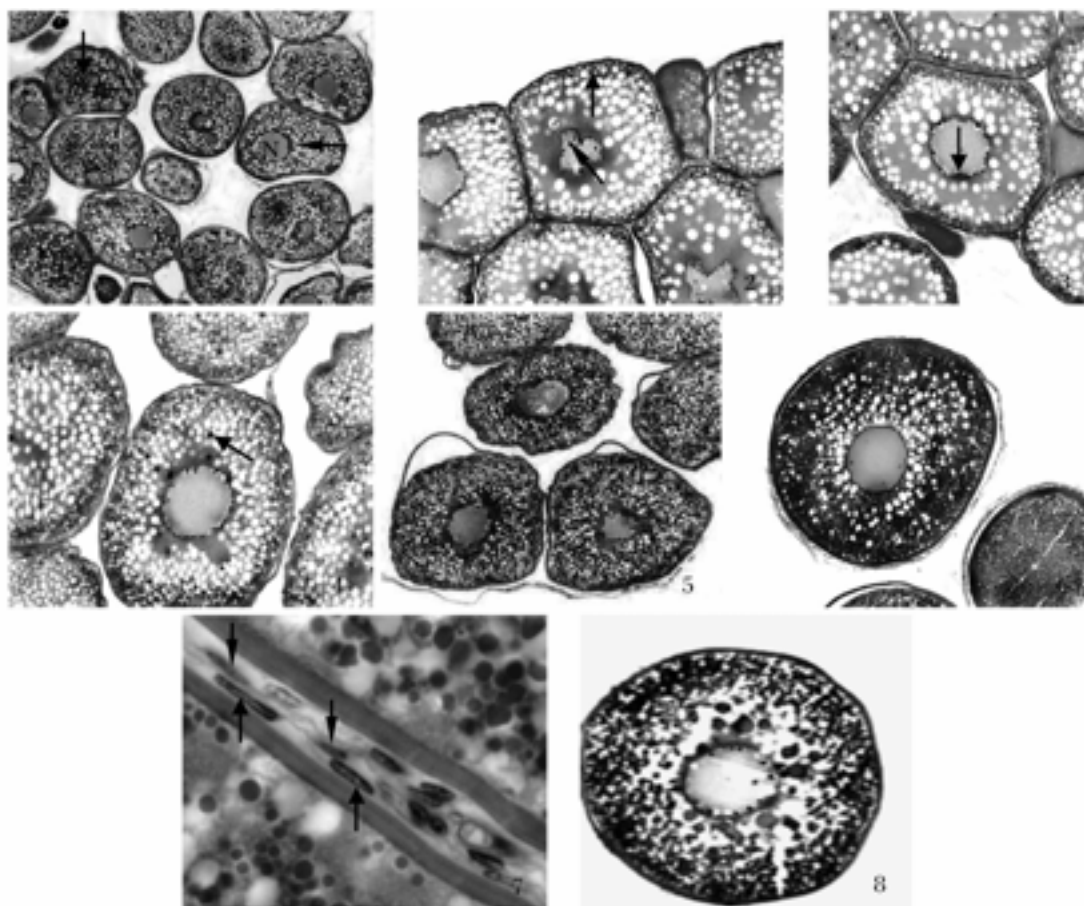
(1. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China;

2. Fisheries Institute of Fujian Province, Xiamen 361012, China)

Abstract: Immunohistochemical localization of LHR, ER and PR was performed using rabbit anti-serum against leuteinizing hormone receptor (LHR or choriogonadotropin receptor CGR), estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR). The aim of study was to reveal the endocrine mechanism of exogenous gonadotropin (CPE and hCG) inducing oogenesis and oocytes maturation in ovary of Japanese eel. The results showed that the ovary development and oogenesis in Japanese eel displayed very marked changes before and after hormones injection. The histological section showed at the early phase of vitellogenesis stage before hormone treatment, oocytes average diameter is about $(220 \pm 0.01) \mu\text{m}$, ten days after the first injection of the combination of two gonadotropins. It differed from control group, yolk nucleus scattered in the surrounding of nucleus and number of nucleolus increased obviously, about 18–20 nucleoli, and about 8–10 nucleoli in the control group. After the third and fourth hormones treatment, the oocytes entered in the early- mid phase and middle phase of vitellogenesis stage and the number yolk granule was increased. After the sixth and seventh hormone treatment, the oocytes entered mature stage from mid-late phase of vitellogenesis stage, the cytoplasm of oocyte were full of yolk granules, cellular diameter and nuclear diameter were increased, about $(570 \pm 1.39) \mu\text{m}$ and $(128 \pm 1.19) \mu\text{m}$, respectively, while no change in the control group. At the same time, the staining results of immunohistochemistry showed that LHR, ER and PR were located on the cytoplasm, nuclear membrane, nucleoplasm, egg envelope and somatic cell. It was worth to note that localization characteristic of the three receptors after the third and fourth hormone treatment, LHR immunoreactivity was located mainly in the cytoplasm of somatic cells (follicle cell at inner layer and thecal cell outside) of oocyte and showed strong immuno-positive reaction, while ER and PR were located in the nucleus. Those results revealed that the endocrine mechanism of exogenous hormones (LH, FSH and hCG) inducing the development and maturation of oocyte in female eel were as follows: first, LH and hCG bound with LH receptor on the somatic cells, which stimulated somatic cells synthesis and secretion estradiol-17 β . Then, E₂ bound with its nuclear receptor in oocyte, stimulating growth and development as well as synthesis of yolk granules in the vitellogenesis stage oocyte. In addition, PR might mediate 17 α -hydroxyprogesterone in the gene effects of oocyte and its final maturation. For the first time, the present study would provide morphological demonstration.

Key words: *Anguilla japonica*; gonadotropin; LH or CG receptor; oogenesis; immunohistochemistry

Corresponding author: FANG Yong-qiang. E-mail: fant98@public.xm.fj.cn

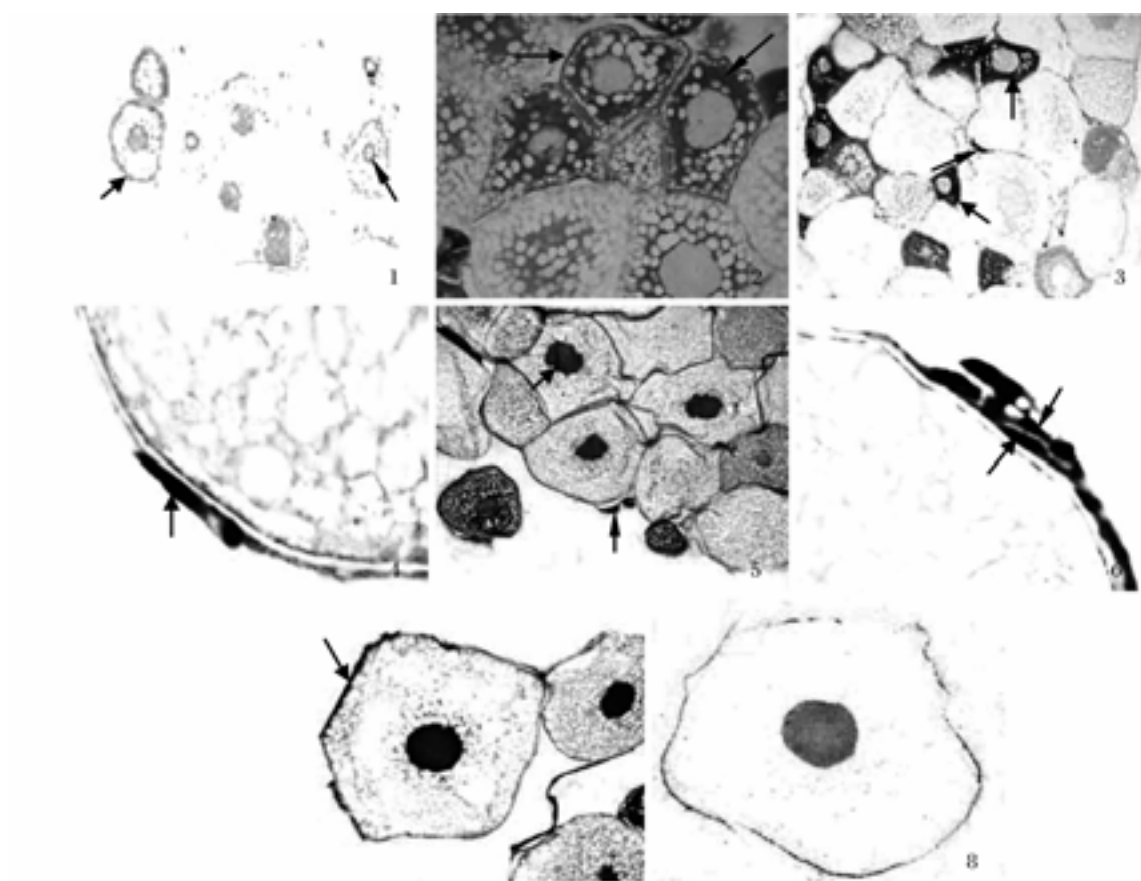


图版 I 注射激素前后雌鳗卵巢组织学切片

1. 注射激素前,早期卵黄发生的卵巢,胞质中大量脂肪泡,网状带(箭头),卵黄核(细箭头),N:生殖胚泡(核)×50; 2. 图1放大,在胞质边缘可见卵黄颗粒(箭头),核仁靠近核膜(细箭头),×100; 3. 激素处理后10 d,核仁数量增加(箭头),×110; 4. 第2次注射后,可见核仁外排(箭头)和卵黄颗粒在数量上增加,×100; 5. 第3和4次注射激素后,卵母细胞进入卵黄发生早-中期和中期,卵黄颗粒分布在胞质中央,×70; 6. 第6次注射后,卵母细胞进入卵黄发生中后期,胞质中卵黄颗粒进一步增加,×60; 7. 卵被膜放大,可见靠近卵被膜滤泡细胞(箭头)和外层膜细胞(细箭头),×810; 8. 第7次注射激素后,卵母细胞进入成熟期,×56。

Plate I The histological section of ovary before and after hormones injection in female eel

1. The early stage of vitellogenesis in ovary before hormone injection, a lot of lipid vesicles exist in cytoplasm. Basophilic dense material (arrow), yolk nucleus (thin arrow), N: germinal vesicle (nucleus) ×50; 2. Fig. 1 amplification, it was seen yolk granules (arrow) in the edge of cytoplasm and the nucleolus is close to the nuclear membrane (thin arrow), ×100; 3. Ten days after hormone treatment, the number of nucleolus increased (arrow), ×110; 4. After the second injection, it is seen nucleolus squeezing from nucleus (arrow) and the number of yolk granules increased, ×100; 5. After the third and fourth injection, the oocytes entered early-mid phase and middle phase of vitellogenesis stage, yolk granules distributed in the center of cytoplasm, ×70; 6. After the sixth injection, the oocytes entered mid-late phase of vitellogenesis stage, yolk granules in cytoplasm further increased, ×60; 7. The amplification egg envelope of oocyte, it was seen follicle cells (arrow) close to egg envelope and thecal cells (thin arrow) in outside, ×810; 8. The oocytes entered mature stage after the seventh injection, ×56.

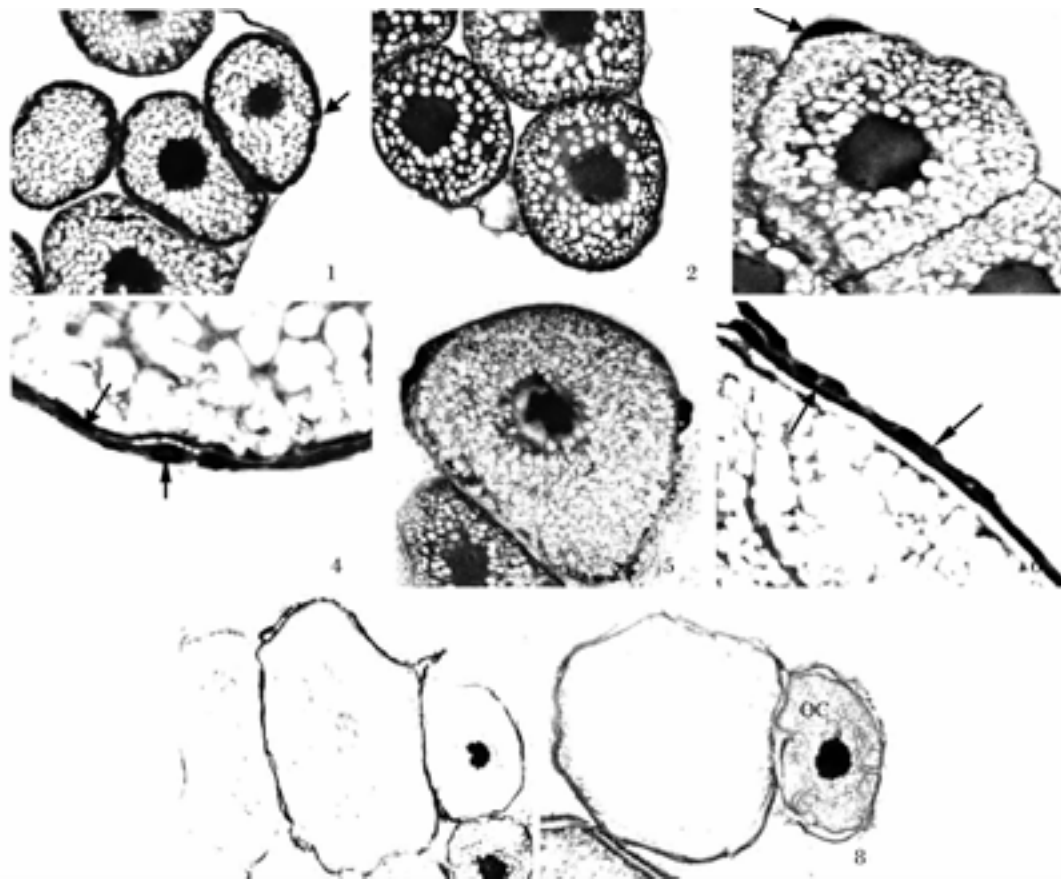


图版 II LH 受体在卵巢中的定位

1. 对照组雌鳗, LH 受体免疫活性定位在少数卵母细胞卵被膜(箭头)、胞质和核膜(细箭头)显示很弱免疫阳性, $\times 50$; 2. 第 1 次注射激素后, LHR 免疫活性定位在卵黄发生早期卵母细胞的卵被膜(箭头)、胞质(细箭头)和核膜, 显示弱免疫阳性, $\times 100$; 3. 第 3 次注射后, 除早期卵母细胞(箭头)胞质显免疫阳性外, 仅见卵黄发生早-中时相卵母细胞上体细胞(细箭头)对 LHR 抗体显示强的免疫阳性反应, $\times 50$; 4. 图 3 卵被膜体细胞放大, 可见贴近卵被膜外层膜细胞显强的免疫阳性(箭头), $\times 700$; 5. 第 5 次注射后, 一些卵黄发生中期卵母细胞的核质(箭头)和体细胞(细箭头)对 LHR 抗体显示强的免疫阳性, $\times 50$; 6. 图 5 卵被膜体细胞放大, 可见内层滤泡细胞(箭头)和外层膜细胞(细箭头)对 LHR 抗体显强的免疫阳性反应, $\times 645$; 7. 第 6 次注射后, LHR 免疫活性在卵黄发生中后期卵母细胞核质和卵被膜体细胞(箭头)显示强的免疫阳性反应, $\times 50$; 图 8. 第 7 次注射后, 卵巢成熟期, 核质和卵被膜显示弱的免疫阳性, $\times 60$ 。

Plate II Localization of LH receptor in the ovary

1. Female eel in the control group, immunoreactive activity of LH receptor was located on the egg envelope(arrow), cytoplasm and nuclear membrane(thin arrow), showing very weak immuno-positive reaction, $\times 50$; 2. After the first injection, immunoreactive activity of LHR was located on the egg envelope(arrow), cytoplasm(thin arrow) and nuclear membrane, showing weak immuno-positive, $\times 100$; 3. After the third injection, except the cytoplasm of early oocyte (arrow) showed immuno-positive, only somatic cells(thin arrow) on the oocyte at early- mid phase of vitellogenesis stage showed strong immuno-positive reaction to LHR antibodies, $\times 50$; 4. The amplification of somatic cell on the egg envelope in figure 3, it was seen thecal cells(arrow) in outside close to egg envelope showing strong immuno-positive, $\times 700$; 5. After the fifth injection, the nucleoplasm(arrow) and somatic cell(thin arrow) of mid-phase of some oocytes showed strong immuno-positive to LHR antibodies, $\times 50$; 6. The amplification of somatic cell on the egg envelope in figure 5, it was seen follicle cell (arrow) inner layer and thecal cell (thin arrow) outside layer showing strong immuno-positive reaction to LHR antibodies, $\times 645$; 7. After the sixth injection, immunoreactive activity of LHR was located on the nucleoplasm, somatic cell(arrow) on the egg envelope at mid-late phase of vitellogenesis stage, showing strong immuno-positive reaction, $\times 50$; 8. After the seventh injection, nucleoplasm and egg envelope showed weak immuno-positive, $\times 60$.

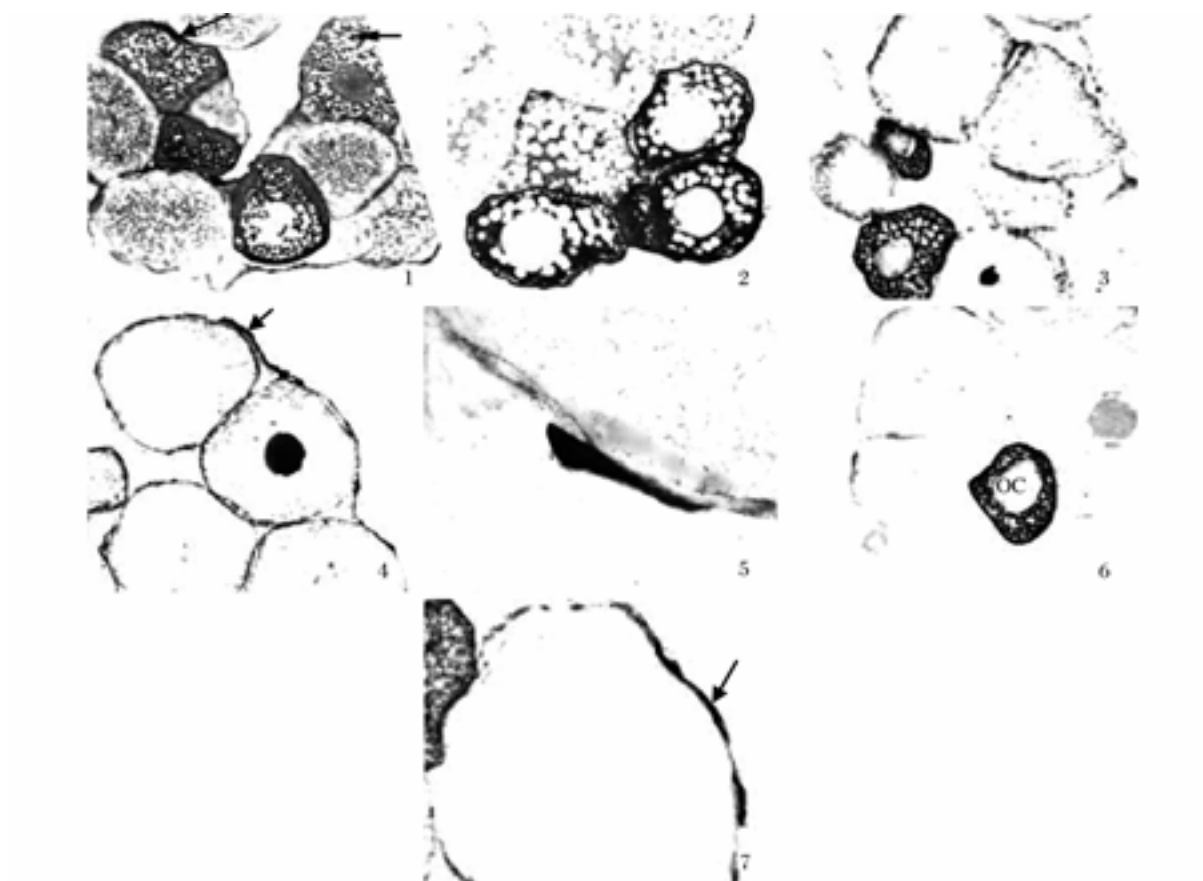


图版Ⅲ ER 在雌鳗卵巢中的定位

1. 对照组雌鳗 ER 免疫活性定位在核质、卵被膜(箭头)和脂肪泡膜(细箭头), $\times 50$; 2. 第 1 次注射激素后, 卵母细胞的 ER 免疫活性有显著的增强, $\times 100$; 3. 第 3 次注射后, ER 免疫活性定位在卵黄发生中期的体细胞上(箭头), 显强的免疫阳性, 核质和胞质阳性减弱, $\times 140$; 4. 图 3 卵被膜的放大, 可见滤泡细胞(箭头)和膜细胞(细箭头)对 ER 抗体显示强的免疫阳性, $\times 500$; 5. 第 5 次注射后, ER 免疫活性定位在卵母细胞核质和体细胞上, 显免疫阳性反应, $\times 140$; 6. 图 5 卵被膜放大, 可见滤泡细胞(箭头)和膜细胞(细箭头)显示强的免疫阳性, $\times 500$; 7, 8. 第 6 和 7 次注射后, 卵黄发生中后期和成熟期卵母细胞卵被膜对 ER 抗体显示免疫阳性变弱, 核质为阴性。OC: 卵黄发生早期卵母细胞, 7. $\times 60$; 8. $\times 50$ 。

Plate III Localization of estrogen receptor in the ovary

1. Female eel in the control group, immunoreactivity of ER receptor was located on the nucleoplasm, egg envelope (arrow), lipid vesicle membrane (thin arrow), $\times 50$; 2. After the first injection, ER immunoreactivity of oocyte had increased obviously, $\times 100$; 3. After the third injection, ER immunoreactivity located somatic cells (arrow) of mid-phase of vitellogenesis stage showed strong immuno-positive, while the positive reaction of cytoplasm and nucleoplasm of oocyte decreased, $\times 140$; 4. The amplification of egg envelope in figure 3, it was seen follicle cell (arrow) and thecal cell (thin arrow) showing strong immuno-positive reaction to ER antibodies, $\times 500$; 5. After the fifth injection, ER immunoreactivity located on the nucleoplasm and somatic cell, showing immunopositive reaction, $\times 140$; 6. The amplification of somatic cell in figure 5, it was seen follicle cell (arrow) and thecal cell (thin arrow) showing strong immuno-positive, $\times 500$; 7, 8. After the sixth and seventh injection, egg envelope of oocyte at mid-late phase of vitellogenesis and mature stage showed immuno-positive from strong to weak to ER antibodies, the nucleoplasm showed immuno-negative. OC: the oocyte at early phase of vitellogenesis, 7. $\times 60$; 8. $\times 50$.



图版IV PR 在雌鳗卵母细胞中的定位

1. 对照组雌鳗 PR 免疫活性定位在卵母细胞的胞质、卵被膜(箭头)和脂肪泡膜(细箭头), $\times 60$; 2. 第一次注射激素后, PR 在卵母细胞免疫活性显示更强免疫阳性反应, $\times 90$; 3, 4. 第 3 和 5 次注射后, PR 免疫活性定位在卵黄发生中期卵母细胞卵被膜上的体细胞(箭头)和核质显免疫阳性, 胞质显免疫阴性, 3. $\times 70$, 4. $\times 56$; 5. 图 4 体细胞放大, 可见滤泡细胞显示强的免疫阳性反应, $\times 500$; 6. 第 6 次注射后, 卵黄发生中-后期卵母细胞卵被膜和核均对 PR 抗体显示免疫阴性, $\times 65$; 7. 成熟期卵母细胞 PR 免疫阳性显示在卵被膜(箭头), OC: 卵黄发生早期卵母细胞, $\times 130$ 。

Plate IV Localization of progesterone receptor in the ovary

1. Female eel in the control group, PR immunoreactivity was located on the cytoplasm, egg envelope (arrow), lipid vesicle membrane (thin arrow), $\times 60$; 2. After the first injection, PR immunoreactivity in oocyte showed more strong immuno-positive reaction, $\times 90$; 3, 4. After the third and fifth injection, PR immunoreactivity was located somatic cells of egg envelope (arrow) and nucleoplasm showed immuno-positive at mid-phase of vitellogenesis stage, while the cytoplasm showed immuno-negative, 3. $\times 70$, 4. $\times 56$; 5. The amplification of somatic cell in figure 4, it was seen follicle cell (arrow) in outside close to egg envelope showing strong immuno-positive, $\times 500$; 6. After the sixth injection, the egg envelope of oocyte at mid-late phase of vitellogenesis stage showed immuno-negative to PR antibodies, $\times 65$; 7. The oocyte of mature stage, PR immunoreactivity showed on the egg envelope, OC: the oocyte at early phase of vitellogenesis, $\times 130$.