

文章编号:1000-0615(2009)04-0572-09

## 外源性促性腺激素诱导日本鳗鲡精子发生和成熟的作用机制

方琼珊<sup>1</sup>, 翁幼竹<sup>2</sup>, 刘志刚<sup>2</sup>, 王涵生<sup>1</sup>, 方永强<sup>2</sup>

(1. 福建省水产研究所, 福建 厦门 361012;

2. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005)

**摘要:**用兔抗血清对抗促黄体素生成素受体(LHR)或称绒毛膜促性腺激素受体(CGR)和雄激素受体(AR)进行LHR和AR免疫组织化学定位,以揭示外源性促性腺激素(鲤脑垂体激素和hCG)诱发日本鳗鲡精子发生及其内分泌机制。结果表明,经过注射激素处理后的实验组与注射前的对照组相比较,其精巢发育和精子发生出现十分显著的变化。组织学切片观察显示,激素处理前鳗鲡精巢处于精原细胞增殖期,而两种激素混合注射后第10天,实验组可见精小叶中精原细胞的有丝分裂和初级与次级精母细胞的数量显著的增加。注射后第35天,靠近生殖上皮除有少量精原细胞外,精小叶中有大量初级精母细胞和次级精母细胞和少数精子细胞以及管腔中存在少量精子。在注射后第83天,日本鳗鲡完成了精子发生和精巢发育成熟以及释精。免疫组织化学染色结果进一步揭示,激素处理前,LH受体免疫活性分布在生殖上皮,显示强的免疫阳性反应;激素处理后,LH受体定位在Sertoli细胞和间质细胞以及精原细胞和初级与次级精母细胞的胞膜上,均显示强的免疫阳性反应。激素处理前,雄激素受体定位在生殖上皮和早期生精细胞的胞膜上;激素处理后,AR则定位在这些生精细胞的核或胞质,而精子细胞和精子显示免疫阴性反应。这些结果首次证明了这两种激素诱导鳗鲡精子发生和成熟的作用机制是通过LH受体和雄激素受体的介导。

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

**中图分类号:**S 917

**文献标识码:**A

国内外学者研究证实,应用外源性促性腺激素,鱼类脑垂体匀浆和人绒毛膜促性腺激素(hCG)可诱导雌雄日本鳗鲡卵巢和精巢的发育和成熟<sup>[1-3]</sup>。

最近,张洁明等<sup>[4]</sup>报道了用鲤垂体激素(CPH)和hCG一起注射到鳗鲡体内诱发精子发生和卵子发生变化的过程。然而,这两种促性腺激素为何能够诱导鳗鲡性腺发育和成熟,林浩然等<sup>[5]</sup>最先报道了鲤脑垂体匀浆和hCG诱导雌鳗性腺发育的机制是这两种促性腺激素直接作用于卵母细胞的滤泡膜,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,而对精巢

发育成熟的机制则未见阐明。

汪小东等<sup>[6]</sup>在对CPH和hCG的作用机理研究中发现这两种激素一起应用可显著增加端脑、间脑、中脑和下丘脑mRnRH的含量。我们认为这两种促性腺激素的靶细胞是性腺,但迄今有关CPH和hCG如何诱发精巢和卵巢的精子发生和卵子发生的内分泌机制,尚未查阅到可利用的资料。所以,本文先就这两种激素一起注射到鳗鲡体内后如何诱发精巢中精子发生及其机制进行研究,目的是为更合理有效地使用激素的剂量和间隔注射时间提供科学依据,同时,还可为雄性日本鳗鲡生殖内分泌学积累基础资料。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

2007年12月从广东省番禺水域收购入海亲鳊,从中选取体质良好,个体适中雄鳊(体长45.0~54.3 cm,体重150~266 g)和雌鳊(体长52.0~64.5 cm,体重217~439 g),然后,这些鳊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,才开始进行注射激素的实验。

### 1.2 方法

实验组于2008年1月14日开始注射外源性激素,鲤鱼脑垂体匀浆和人绒毛膜促性腺激素,剂量分别是雄鱼每尾0.2 mg和25 IU,隔1或2周注射一次。注射前随机取未注射雄鳊为对照组,用丁香酚麻醉,接着测量体长和称体重后,解剖取出精巢,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 塑料石蜡包埋。精巢组织学切片厚2 μm,苏木精-伊红染色,用于判断注射前雄性鳊精巢发育的时期。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,作为注射激素前的对照组,观察其对 hCG 受体和雄激素受体(AR)的敏感性。开始注射后每周取材一次,第3次后改为3周才取材,方法同上,往后持续到轻压雄鳊腹部能流出精液作为精巢成熟的标志。

### 1.3 免疫组织化学

切片经脱蜡水化后,放入3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中10 min,以阻断内源性过氧化物酶活性。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,分别是兔抗人绒毛膜促性腺激素受体(hCGR)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)和雄激素受体的多克隆抗体(1:50~150),4℃孵育36~48 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公司),室温下孵育30 min, PBS轻洗,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 河鳊入海时的精巢发育组织学特点

从广东省番禺水域采集下海雄鳊,未经激素处理的对照组,精巢组织学切片观察结果表明,根据精原细胞在精巢中的排列分布模式<sup>[7-9]</sup>,日本鳊属叶型精巢结构,其发育已处于精原细胞增殖期或少数为精母细胞期,它的细胞生物学特点是:在精小叶中可见精原细胞靠近生殖上皮,核大为圆形,居中,有1~2个核仁,胞质着色很浅。Sertoli 细胞与精原细胞相间排列或位于一侧,核不规则,胞质不易着色,在精小叶之间还可见Leydig 细胞或称间质细胞,细胞为扁平形。另外,在少数胞囊中可见初级精母细胞(图版 I-1, 2)。

### 2.2 注射外源性促性腺激素对精巢发育的影响

注射激素后第10天,随机取雄性鳊精巢组织学切片观察结果表明,前者精小叶中各个胞囊开始出现分化,有的胞囊中可见精原细胞有丝分裂,有的胞囊出现分化的初级精母细胞(图版 I-3)。激素处理2周后鳊精巢精小叶中初级和次级精母细胞的数量显著增加(图版 I-4)。

第3次注射激素后,即第35天,有的雄鳊精巢为粉红色,其特点是:靠近生殖上皮除有少量精原细胞外,精小叶中有大量初级精母细胞和次级精母细胞和少数精子细胞以及管腔中存在少量精子。另有的雄鳊精巢为乳白色,与粉红色精巢的不同在于管腔中精子细胞和精子的数量显著的增加(图版 I-5,6)。

第5次注射激素后,即第56天,扇形精巢的特点是:扇高1.2 cm,显乳白色。精巢切片观察结果表明,此期精巢与第3次注射激素精巢显著的不同是:(1)靠近生殖上皮原始的生精细胞的层次减少,由原来的6~7层减少为3层,且多数为次级精母细胞;(2)管腔中精子数量明显的增多(图版 I-7)。第7次注射后,即第83 d,雄鳊腹部松软,轻压腹部可见乳白色精液流出,此时期称为鳊精巢成熟期。精巢切片观察结果是,靠近生殖上皮仅见少数精原细胞散在分布在精小叶不同部位,多数成行排列是次级精母细胞和精子细胞,管腔中充满成熟精子(图版 I-8)。未经激素

处理对照组精巢发育仍处在精原细胞增殖期,仅是初级精母细胞数量有所增加。

### 2.3 促黄体生成素受体(LHR,或称绒毛膜促性腺激素受体CGR)和雄激素受体(AR)在鳊鲮精巢的分布

免疫组织化学染色结果显示,促性腺激素处理前后不同时间,LHR或CGR和AR免疫活性定位在日本鳊鲮精巢的生精细胞和非生殖细胞上,对照片则显免疫阴性反应。

LH受体在鳊鲮精巢的定位——激素处理前和处理后不同时间,LH受体定位在鳊鲮精巢发育的不同时期出现显著的变化。激素处理前,LH受体免疫活性分布在生殖上皮,显示强的免疫阳性反应(图版II-1)。第2次注射后,LH受体定位在精小叶中的精原细胞、Sertoli细胞,个别在初级精母细胞和精小叶之间的Leydig细胞(间质细胞),阳性物质在胞膜或沿胞膜分布,且对LH受体的抗体显示强的免疫阳性反应(图版II-2)。随着前两次激素的处理导致精巢进一步发育,第3次处理后,精巢免疫染色结果发现,虽然LH受体的免疫活性仍分布在精小叶胞囊中精原细胞、初级精母细胞和次级精母细胞和间质细胞,并显示免疫阳性反应,但阳性细胞数量增加(图版II-3)。第5次激素处理后,与前几次显著的不同在于,促性腺激素促使位于生殖上皮基部Sertoli细胞和精小叶之间的间质细胞进一步发育成熟,表现在这两种非生殖细胞对LH受体显示强的免疫阳性反应,阳性物质沿Sertoli细胞和间质细胞的胞膜和胞质分布,核显示免疫阴性,同时,两种体细胞体积增大(图版II-4,5),其余精子细胞和精子均显免疫阴性反应。第7次注射激素后,即日本鳊鲮激素处理83d后,鳊鲮精巢发育成熟,取材时轻压鱼腹可见精液流出,此时精巢对LH受体的抗体应答特点是,仅在靠近生殖上皮基部有多层生精细胞,如精原细胞、初级和次级精母细胞显示免疫阳性,而管腔中未排出精子显免疫阴性,对照片则显示免疫阴性(图版II-6,7)。未经激素处理对照组精巢免疫组织化学染色结果与开始一样,即LH受体免疫活性仍只定位在生殖上皮,而生精细胞显示免疫阴性反应。

雄激素受体在鳊鲮精巢的定位——激素处理前后雄激素受体在鳊鲮精巢的免疫组织化学染色结果显示,这两种激素一起处理之前,AR定位在

生殖上皮和早期生精细胞的胞膜上(图版III-1)。随着注射激素次数的增加和时间的延续,AR定位有显著的差别:激素处理后2周,AR定位在精原细胞的核和沿胞膜分布的胞质以及初级精母细胞胞质,显深棕褐色,呈强的免疫阳性反应,而精子细胞和精子则显免疫阴性反应(图版III-2)。第3次注射激素后,精巢进一步发育,管腔中精子数量增加,这个时期精巢的特点是AR免疫活性主要定位在靠近生殖上皮的一些初级精母细胞和少数次级精母细胞,阳性物在精母细胞胞质或核,以及个别精原细胞(图版III-3)。第5次注射激素后,精巢仍在发育成熟,AR定位的特点是:阳性细胞的数量减少,轻压腹部未能流出精液,此时AR免疫活性仅定位在少数精原细胞的核,初级精母细胞和个别次级精母细胞胞质(图版III-4)。第7次注射激素后,轻压腹部能够流出精液,AR只定位在成熟精巢的生殖上皮(图版III-5)。未经激素处理对照组精巢AR定位与处理前的定位类似。

### 3 讨论

脊椎动物(包括鱼类)雄性生殖细胞的产生有赖于脑垂体FSH和LH两种促性腺激素的分泌作用<sup>[10]</sup>,而CG是人胎盘绒毛膜细胞分泌一种促性腺激素,其特性是它的生理作用与脑垂体LH等同,且与LH在性腺细胞中共享一个共同的受体,没有种的特异性,但在非性腺组织LH/hCG分布有组织特异性<sup>[11-12]</sup>。然而,关于hCG和脑垂体促性腺激素一同混合注射诱导日本鳊鲮精巢发育和成熟的作用机制,迄今仍未查阅到可利用资料。为了揭示这两种促性腺激素诱发日本鳊鲮精巢发育成熟的内分泌机制,我们采用LH受体和雄激素受体的抗体对经激素处理前和经hCG与鲤鱼脑垂体匀浆混合注射后不同时间,观察精巢中精子发生过程,并对精巢进行免疫组织化学定位,结果首次发现这两种促性腺激素的作用机制:

(1)首先是hCG与脑垂体LH与精巢中Sertoli细胞和Leydig细胞(或称间质细胞)胞膜上LH受体特异性结合,介导其细胞生理效应。表现在激素处理前雄鳊精巢仅是生殖上皮对LHR抗体发生免疫阳性,而生殖细胞和体细胞则否。第2次激素处理后,LHR免疫阳性定位在

Leydig 细胞、Sertoli 细胞、精原细胞和初级精母细胞,提示 hCG 和脑垂体 LH 开始激发间质细胞产生雄激素,始动雄鳗精子发生。证据是可见精巢中精原细胞的有丝分裂和次级精母细胞的出现(图版 I-3,4)。最突出的表现是雄鳗经第 5 次注射激素后,促使间质细胞和 Sertoli 细胞的发育成熟,表现在这两种体细胞对 LHR 抗体产生强的免疫活性,细胞体积增大(图版 II-4,5),此情况与前人报道垂体 LH 和 hCG 的靶细胞是间质细胞<sup>[13]</sup>,它们能够共同激发间质细胞产生鱼类雄激素 11-酮基睾酮。研究表明,作为 FSH 细胞表面受体专一在精巢中 Sertoli 细胞表达<sup>[14]</sup>,FSH 还能诱发 11-KT 的产生,在早期精子发生时起作用,而 LH 刺激通过特异性受体产生的 11-KT 则在精子形成时起作用,同时,11-酮基睾酮,已知始动精子发生和能够刺激精原细胞 DNA 的合成<sup>[15-16]</sup>。由此可见,hCG 和垂体 LH 与 FSH 三者互相协调共同担负着激发雄鳗的精巢发育成熟和精子发生的全过程中的第一步使雄鳗精巢产生足够的雄激素始动精子发生。因为鱼类生殖内分泌研究表明,鱼类精子发生是由 3 个主要的时相组成:有丝分裂、精原细胞增殖,精母细胞成熟分裂和精子形成并变态为精子<sup>[17]</sup>。这 3 个时相中两个时相都必须依赖于雄激素的存在。有人进一步研究发现,一次注射 HCG,在 72h 显著诱导精巢形态学的变化和血清雄激素水平。形态学变化包括精原细胞增殖、激活间质细胞和 Sertoli 细胞,在精巢中构建生精小管和叶状腔形成<sup>[18]</sup>。此情况与本研究看到注射 hCG 和脑垂体激素后精巢发生的组织学变化和免疫组织化学定位的结果相一致,这就为我们揭示两种促性腺激素诱发雄鳗精子发生和成熟的作用机制第一步诱发雄激素产生提供可靠的证据。现在我们还不明白的是早期生精细胞对 LHR 显示免疫活性,除了提示 hCG 和脑垂体匀浆中促黄体激素可直接始动早期生精细胞的发育外,是否还有其它生理作用及其意义,有待进一步研究。

(2)了解雄激素在雄鳗精子发生中的作用,就能够回答两种促性腺激素如何诱发精子发生的过程。研究表明,雄激素(11-酮基睾酮)有两个生理作用,一是激发精子发生的全过程;二是进一步启动 Sertoli 细胞的发育和分化。直接的证据是来自切除肿瘤垂体的病人,未能检测到血清促性

腺激素水平的情况下,应用睾酮替代疗法,没有想到使其妻子受孕,做了 3 个孩子的父亲。说明睾酮完全可以完成精子发生<sup>[19]</sup>。Todo 等<sup>[20]</sup>也证明,11-KT(硬骨鱼类一种潜在雄激素)完全能够诱导日本鳗鲡精子发生。至于雄激素对 Sertoli 细胞的作用,有研究指出 Sertoli 细胞存在 AR,雄激素在 Sertoli 细胞增殖和成熟以及支持精子发生起重要的作用<sup>[21-22]</sup>。这里,必须指出的是雄激素的作用必须通过它的特异性受体的介导,雄激素受体是一种核受体,现已从日本鳗鲡精巢中分离出 AR,其 cDNA 密码含有全部开放式阅读框密码 848 个氨基酸残基。鳗鲡 AR 氨基酸顺序显示与其它鱼类 ARs 高度同源<sup>[23]</sup>。本研究 AR 免疫组化定位结果显示,AR 定位在激素处理后精巢中精原细胞、Sertoli 细胞、初级精母细胞和次级精母细胞的核内,少数在胞质(图版 III-2-4),此结果有力地证明了雄鳗精巢中产生雄激素通过与其相应的受体结合后激发其生精活动,表现在激素处理后雄鳗精巢组织学切片所见精原细胞的分裂和精母细胞数量的增加,并始动整个精子发生的过程,导致精巢发育成熟就是一个很好的佐证。同时与我们先前报道 AR 定位在早期生精细胞相一致<sup>[24]</sup>。我们还认为混合注射这两种促性腺激素诱发雄鳗精子发生的机理非常复杂,本研究仅是初步揭示其内分泌机制,还有一些问题需要进一步研究,如 FSH 受体在雄鳗的定位和 FSH 对孕酮产生的影响,因为新近研究指出孕酮在雄鳗精子发生中的成熟分裂和精子形成也起作用<sup>[25]</sup>,这些问题都有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 林 鼎,林浩然. 鳗鲡繁殖生物学研究 III. 鳗鲡性腺发育组织学和细胞学研究[J]. 水生生物学集刊,1984,8:157-164.
- [2] 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.
- [3] Tanaka H, Ohta H, Kagawa H. Development of techniques for artificial induction of maturation and rearing larvae of Japanese eel[J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 2000, 66: 623-626.
- [4] 张洁明,柳 凌,郭 峰,等. 人工诱导日本鳗鲡性腺发育组织学研究[J]. 中国水产科学,2007,

- 14(4):593-602.
- [5] 林浩然,谢刚,张利红,等. 激素诱导鳗鲡性腺发育成熟和排卵的作用机理[M]//中国动物学会编,中国动物科学研究.北京:中国林业出版社,1999:42-47.
- [6] 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[J]. 水产学报,2000,24(2):123-129.
- [7] Billard R, Fostier A, Weil C, *et al.* Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish[J]. *Can J Aquat Sci*, 1982, 39:66-79.
- [8] Grier H J. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes[J]. *Amer Zool*, 1981, 21:345-357.
- [9] 林君卓,翁幼竹,方永强,等. 鲷鱼精子发生的组织学研究[J]. 台湾海峡,2001,20:57-61.
- [10] Simoni M, Weinbauer G F, Gromoll J, *et al.* Role of FSH in male gonadal function [J]. *Annales d'Endocrinologie*, 1999, 60:102-106.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Schulz R W, Vischer H F, Cavaco J E B, *et al.* Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)*, 2001, 129B:407-417.
- [14] Hermann B P, Heckert L L. Transcriptional regulation of the FSH receptor: New perspectives [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2007, 262:100-108.
- [15] Maugars G, Schmitz M. Expression of gonadotropin and gonadotropin receptor genes during early sexual maturation in male Atlantic salmon parr [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2008, 75:403-413.
- [16] 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 [C]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103:7333-7338.
- [17] Schulz R W, Miura T. Spermatogenesis and its endocrine regulation [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2002, 26:43-56.
- [18] Saksena D N, Miura T, Jiang J, *et al.* A rapid activation of immature testis of Japanese eel (*Anguilla japonica*) by a single injection of human chorionic gonadotropin [J]. *Journal of Biosciences*, 1995, 20:675-689.
- [19] Simoni M, Weinbauer G F, Gromoll J, *et al.* Role of FSH in male gonadal function [J]. *Annales d'Endocrinologie*, 1999, 60:102-106.
- [20] Todo T, Ikeuchi T, Kobayashi T, *et al.* Fish androgen receptor: cDNA cloning, steroid activation of transcription in transfected mammalian cells, and tissue mRNA levels [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, 254:378-383.
- [21] 方永强. 精子发生及其控制 [J]. *生物科学动态*, 1978, 79:15-22.
- [22] Holdcraft R W, Braun R E. Hormonal regulation of spermatogenesis [J]. *International Journal of Andrology*, 2004, 27:335-342.
- [23] Tan K A, De Gendt K, Atanassova N. The role of androgens in sertoli cell proliferation and functional maturation: studies in mice with total or sertoli cell-selective ablation of the androgen receptor [J]. *Endocrinology*, 2005, 146:2674-2683.
- [24] 方永强,翁幼竹,胡晓霞. 性类固醇激素及其受体在文昌鱼性腺和神经系统中的分布 [J]. *动物学报*, 2001, 47(4):398-403.
- [25] 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 [C]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103:7333-7338.

## The action mechanism of exogenous gonadotropin inducing spermatogenesis and maturity of testis in Japanese eel, *Anguilla japonica*

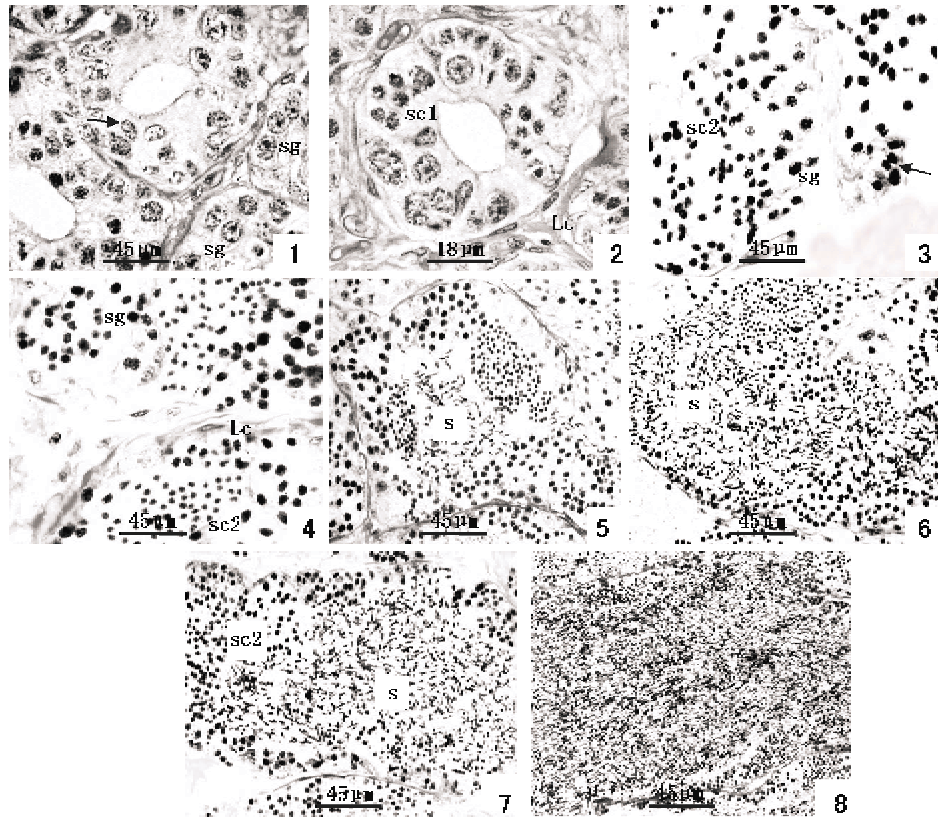
FANG Qiong-shan<sup>1</sup>, WENG You-zhu<sup>2</sup>, LIU Zhi-gang<sup>2</sup>, WANG Han-sheng<sup>1</sup>, FANG Yong-qiang<sup>2</sup>

(1. Fisheries Institute of Fujian Province, Xiamen 361012, China;

2. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Immunohistochemical localization of LHR and AR was performed by using rabbit anti-serums against leuteinizing hormone receptor (LHR or choriogonadotropin receptor CGR) and androgen receptor (AR). The aim of present study was to reveal the endocrine mechanism of exogenous gonadotropin (CPH and hCG) inducing spermatogenesis in testis of Japanese eel. The results showed that the testis and spermatogenesis in Japanese eel displayed very marked changes after hormone injection. The observation of histological section showed the testis of eel was at the stage of spermatogonia proliferation before hormone treatment, while ten days after the injection of the combination of two gonadotropins, the spermatogonia mitosis and number increase of primary and second spermatocytes in the lobule of testis of male eel were seen. Thirty-five days after hormone treatment, a lot of primary and second spermatocytes in the lobule of testis as well as some sperms in the lumen of seminiferous tubule, except a few spermatogonia near reproductive epithelium, could be seen. Eight-three days after hormone treatment, the spermatogenesis and the development and maturity as well as spermiation of testis in male eel completed. Immunohistochemical staining results further revealed that LH or CG receptors immunoreactivity was located on the reproductive epithelium showing strong immuno-positive reaction before hormone treatment, while LH receptors immunoreactivity was located on the cytomembrane of Sertoli cells, Leydig cell or interstitial cell, spermatogonia, primary and second spermatocytes showing strong immuno-positive reaction after hormone treatment. Before hormone treatment, androgen receptors were located on the cytomembrane of spermatogenic cells and reproductive epithelium, while AR were located within nucleus or in cytoplasm of these spermatogenic cells, but spermatids and sperm showed immuno-negative reaction. The results demonstrated for the first time that the action mechanism of two hormones inducing spermatogenesis and maturity in eel is mediated by their corresponding receptors. Thus, the present study will provide scientific basis for the dosage and intervallic time of injecting hormones during artificial propagation of eel.

**Key words:** *Anguilla japonica*; gonadotropin; hCG receptor; spermatogenesis; immunohistochemistry

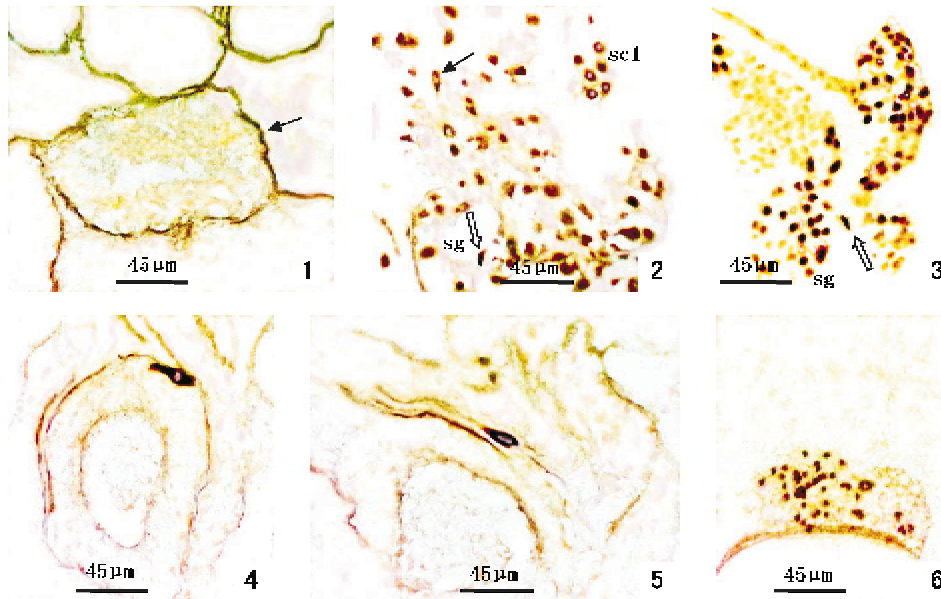


图版 I 雄鳗注射激素前后精巢组织学切片

1. 注射激素前精原细胞增殖期,可见精原细胞(sg)和Sertoli细胞(细箭头);2. 图版I-1放大,可见初级精母细胞(sc1)和精小叶之间的间质细胞(Lc);3. 激素处理后10 d,可见精巢中精原细胞有丝分裂(细箭头),以及初级和次级精母细胞(sc2);4. 激素处理2周后,初级和次级精母细胞的数量显著地增加;5,6. 激素处理35 d后,在雄鳗粉红色精巢中,可见管腔存在少量精子细胞和精子(s),而图版I-6,在乳白色精巢,精子(s)数量显著的增加;7. 激素处理56 d后,靠近生殖上皮有次级精母细胞(sc2)和管腔中大量精子(s);8. 激素处理83 d后,管腔中充满成熟精子

**Plate I The histological section of testis before and after hormone injection in male eel**

1. The multiplicative stage of spermatogonia before hormone injection, spermatogonia (sg) and Sertoli cell (arrow) in testis of male eel were seen; 2. Plate I-1 amplification, primary spermatocytes (sc1) and Leydig cell(Lc) between lobules were seen; 3. Ten days after hormone treatment, spermatogonia mitosis (arrow), primary and second spermatocytes (sc1 and sc2) could be seen; 4. The number of primary and second spermatocytes (sc1 and sc2) increased obviously after hormone treatment for two weeks; 5,6. In the pink testis (Plate I-5) of male eel, some spermatids and sperms existed in the tubular cavity, and the number of sperms increased obviously in the milky white testis (Plate I-6); 7. After 56-days hormone treatment, it is seen second spermatocytes (sc2) near reproductive epithelium and a lot of sperms in the tubular cavity; 8. Full ripe sperms existed in the tubular cavity after 83-days hormone treatment



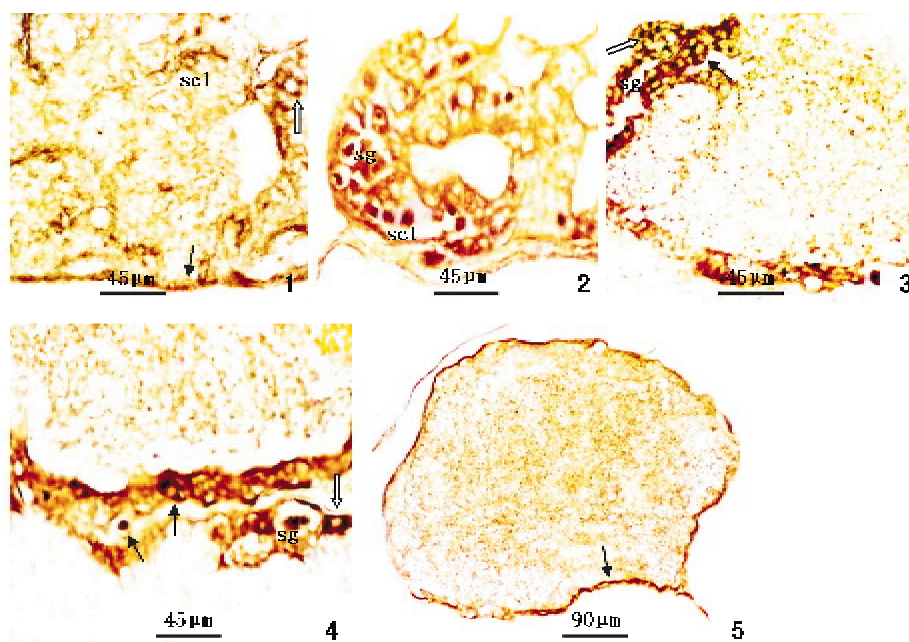
图版 II hCG 受体在精巢的定位

1. 激素处理前, hCG 受体免疫活性定位在生殖上皮(箭头)显示强的免疫阳性反应; 2. 第 2 次注射激素后, hCG 受体免疫活性定位在精原细胞 (sg)、Sertoli 细胞(细箭头)、初级精母细胞 (sc1) 和间质细胞(空心箭头); 3. 第 3 次注射激素后, 与上次不同是 hCG 受体免疫阳性细胞数量增加; 4, 5. 第 5 次激素处理后, 主要特点是 Sertoli 细胞和间质细胞发育成熟, 显示强的免疫阳性反应, 阳性物沿着胞膜分布; 6. 第 7 次激素处理后, 可见成熟精巢仅见靠近生殖上皮精原细胞、初级和次级精母细胞显示免疫阳性

**Plate II Localization of hCG receptor in the testis**

1. Immunoreactive activity of hCG receptor was located on the reproductive epithelium (arrow), showing strong immuno-positive reaction; 2. After the second hormone injection, immunoreactive activity of hCG receptor was located in the spermatogonia (sg), Sertoli cell (thin arrow), primary spermatocytes (sc1) and Leydig cell (hollow arrow); 3. After the third hormone injection, the number of immuno-positive cells of hCG receptor increased compare with the second time; 4, 5. After fifth hormonal treatment, the main characteristic was the development and maturity of Sertoli cell and Leydig cell, showing strong immuno-positive reaction, and positive substance was distributed along cytomembrane; 6. After seventh hormonal treatment, spermatogonia, primary and second spermatocytes near reproductive epithelium showed immuno-positive





图版Ⅲ 雄激素受体在精巢定位

1. 激素处理前,AR 定位在生殖上皮(细箭头)和精原细胞(空心箭头)及初级精母细胞(sc1)的胞膜上;2. 激素处理2 周后,AR 免疫活性定位在精原细胞(sg)和初级精母细胞(sc1)的核内和胞质,而精子细胞和精子显示免疫阴性;3. 第3 次注射激素后,AR 免疫活性定位在靠近生殖上皮精原细胞(sg),初级和次级精母细胞(细箭头,空心箭头)的核或胞质;4. 第5 次注射激素后,AR 免疫活性定位在精原细胞(sg)核内和初级(细箭头)与次级(空心箭头)精母细胞的胞质;5. 第7 次注射激素后,AR 免疫活性定位在成熟精巢的生殖上皮(箭头)

### Plate III Localization of androgen receptor in the testis

1. AR was located on the reproductive epithelium (thin arrow) and on the cell membrane of spermatogonia(hollow arrow) and primary spermatocytes (sc1) before hormonal treatment; 2. After 2-week hormonal treatment, AR immunoreactive activity was located within nucleus and cytoplasm of spermatogonia and primary spermatocytes, while spermatids and sperm showed immuno-negative; 3. After third hormone injection, AR immunoreactive activity were located within the nucleus or in the cytoplasm of spermatogonia, primary and second spermatocytes; 4. After fifth hormone injection, AR immunoreactive activity were located within the nucleus of spermatogonia and in the cytoplasm of primary and second spermatocytes; 5. After seventh hormone injection, AR immunoreactive activity were located on the reproductive epithelium (arrow) in mature testis