

人工诱导花鳗鲡卵巢发育成熟及相关激素和组织的作用

林浩然^{1,2*}, 齐鑫¹, 周雯伊¹, 尹绍武¹,
黄海^{1,2}, 张勇², 刘晓春², 陈国华¹

(1. 海南大学海洋学院暨热带生物资源教育部重点实验室, 海南 海口 570228;
2. 中山大学水生经济动物研究所暨广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东 广州 510275)

摘要: 采用多次肌肉注射黄体生成素释放激素(luteinizing hormone releasing hormone, LHRH-A₂)和鲤脑垂体匀浆(carp pituitary extract, CPE)的方法诱导花鳗鲡卵巢发育成熟。在任意挑选的15尾实验组鱼中,5尾卵巢发育完全成熟,平均性腺系数(gonadosomatic index, GSI)为(20.9±5.04)% (最大达到27.3%);5尾卵巢发育至成熟期,平均GSI为(7.2±2.86)%;5尾卵巢发育至卵黄生成期,平均GSI为(2.32±1.5)%;而对照组的性腺停留在未发育的Ⅱ期[GSI为(1.18±0.39)%],这表明注射的激素能诱导雌性花鳗鲡性腺发育直到完全成熟。检测卵巢发育过程中脑垂体GtH的mRNA水平,血清中类固醇激素水平以及肝脏和消化道组织学变化。结果表明,脑垂体中GtH α 、LH β 和FSH β 的mRNA水平随着卵巢的发育而逐渐增加,在卵巢发育成熟后下降,其中GtH α 和LH β 的含量在卵巢发育成熟时虽比发育时期略有下降,但仍然呈现高表达量,而FSH β 在卵巢发育成熟时的表达量极低,几乎检测不到。血清雌二醇的含量在卵巢开始发育和卵黄生成期时的含量较高,随着卵巢的发育成熟而下降;睾酮的含量在卵巢发育成熟过程中有所增加,在卵巢发育成熟时明显升高。肝糖原过碘酸希夫反应染色(periodic acid shiff, PAS)染色结果显示随着卵巢的发育成熟,肝细胞中糖原颗粒逐渐减少,脂肪含量有所增加,肝糖原参与卵巢生成过程中的物质与能量代谢活动。胃壁和肠壁的组织学显示,随着卵巢发育成熟而出现不同程度的退化。

关键词: 花鳗鲡; 人工诱导; 卵巢; 促性腺激素; 类固醇激素; 肝脏; 消化道

中图分类号: Q 954.4; S 917

文献标识码: A

花鳗鲡(*Anguilla marmorata*)隶属硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鳗鲡目(Anguilliformes)、鳗鲡科(Anguillidae)、鳗鲡属(*Anguilla*),是一种数量稀少、经济价值高的食用鱼类。在我国主要分布于海南、福建、广东等地。鳗鲡的人工繁殖开始于上个世纪40年代,国内外学者对此做了大量的研究。1974年Yamamoto等^[1]利用鲑脑垂体匀浆诱导日本鳗鲡性腺发育成熟并且首次获得了第一批仔鳗,仔鱼存活了120 h。1980年王义强等^[2]利用鲤脑垂体和HCG诱导日本鳗鲡性成熟并产卵,获得少量仔鳗,存活19 d。2001年Tanaka

等^[3]利用鲨鱼卵粉末投喂幼苗,首次观察到人工催产下的日本鳗鲡幼鱼向柳叶鳗的转变过程。2009年Okamura等^[4]利用浮游生物与人工催产下的日本鳗鲡幼苗混养,发现幼苗下颚骨畸形的发生率减少,提高了人工催产下鳗鲡幼苗的成活时间。这些研究主要集中在通过多次注射外源GtH或GnRH类似物等促使鳗鲡性腺发育成熟,并诱导其排精和产卵,从而获得早期的胚胎。此外,还有很多学者致力于鳗鲡繁殖内分泌学的研究,结果表明鳗鲡和其他硬骨鱼一样,性腺发育是脑垂体合成和分泌的GtH作用的结果,GtH的功

收稿日期:2010-03-03 修回日期:2010-04-22

资助项目:国家自然科学基金面上项目(30770283);国家“十一五”科技支撑计划重点项目(2007BAD29B03);海南省教育厅高等学校科学研究资助项目(Hjkj2008-22);广东省科技兴海(渔)项目(B200701A06)

通讯作者:林浩然, E-mail: lsslhr@mail.sysu.edu.cn

能受下丘脑合成和分泌的 GnRH 和促性腺激素释放的抑制因子的双重神经内分泌调节,并且性类固醇激素雌二醇(E_2)、睾酮(T)等对性未成熟鳊的性腺发育存在反馈调节作用^[5-8]。

参照日本鳊人工催熟的方法和经验^[9-12],我们采用多次肌肉注射人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, HCG)的方法诱导雄性花鳊性腺发育成熟,催熟效果良好并获得了有活力的精子^[13]。接着,我们采用多次肌肉注射 LHRH- A_2 和 CPE 的方法诱导雌性花鳊性腺发育成熟,并且检测卵巢发育不同时期脑垂体中促性腺激素(GtH)mRNA 水平和血清中类固醇激素水平的变化,以阐明这些激素在诱导雌性花鳊性腺发育成熟过程中的作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

20 尾雌性花鳊购于海南三亚市,体重为 1 305 ~ 2 890 g,体长为 73 ~ 97 cm。每尾鱼分别在规格为 100 cm × 60 cm × 50 cm 的淡水水族箱中驯养 2 周,驯养期间投喂,鱼正常摄食。然后过渡到盐度 15 的海水,开始催熟实验,水温控制在 20 ~ 26 °C,实验期间鱼不摄食。

1.2 实验设计

实验鱼随机分为对照组(5 尾)和实验组(15 尾),实验组肌肉注射 LHRH- A_2 和鲤脑垂体匀浆(CPE)的混合物,处理时间为 20 周,每 7 ~ 8 天注射一次,每次注射 LHRH- A_2 的剂量为每千克体重 250 μ g, CPE 的剂量为每千克体重 4 粒,鲤脑垂体购自鱼市场, LHRH- A_2 为宁波三生制药有限公司产品(品名为促排二号)。对照组肌肉注射生理盐水,试验结束后,对所有鱼尾部静脉取血,血清保存于 -80 °C,待测 T 和 E_2 含量。解剖前称量其体重,解剖后称量其性腺重、肝脏重和消化道重,分别计算性腺系数、肝体系数、消化道系数[性腺系数 = (生殖腺重/体重) × 100%; 肝体系数 = (肝脏重/体重) × 100%; 消化道系数 = (消化道重/体重) × 100%]。取脑垂体保存于液氮中,待检测 GtH α 、LH β 和 FSH β 的 mRNA 含量。将肝脏组织、消化道组织以及性腺组织浸泡于固定液中,待观察其组织学构造。

1.3 实验方法

类固醇激素(E_2 , T)含量的测定方法 血

清雌二醇(E_2)、睾酮(T)质量浓度采用放射免疫方法(RIA)测定。放射免疫测定试剂盒购自北京原子能科学研究院同位素研究室(北京), E_2 的测量灵敏度为 2 pg/mL。批内变异系数(CV)平均 6.5% ($n = 10$); 批间变异系数为 8.3% ($n = 10$)。在血清样品中加入低、中、高已知质量浓度的 E_2 , 测定回收率为 101.5% ~ 114%。T 的测量灵敏度为 3 ng/mL, 批内变异系数(CV)小于 10% ($n = 10$), 批间变异系数小于 15% ($n = 10$), 回收率为 107% ~ 110%。样品测定均采用双管平行。

GtH 3 个亚基 mRNA 水平的测定方法

(1) 总 RNA 提取及反转录。将在液氮中冻存的脑垂体组织取出,在 Trizole 试剂中用 1 mL 一次性塑料注射器匀浆,氯仿抽提,异丙醇沉淀,适量 DEPC 水溶解总 RNA。用 1% 琼脂糖电泳检测 RNA 的质量。准确量取各组织样品总 RNA 1 μ g, 采用 Oligo(dT)18 引物和逆转录酶 Super ScriptTM II RT 在 20 μ L 反应体系中合成 cDNA。

(2) 引物设计。参照 GenBank 中花鳊 GtH α (FJ490345)、FSH β (FJ490346)、LH β (FJ490347), 运用 primer premier 5.0 软件分别设计各基因的特异性引物(表 1)。

表 1 荧光定量 PCR 分析所用引物
Tab. 1 Primers used for real-time quantitative PCR analysis

引物名称 primer name	引物序列 sequence(5'-3')	引物用途 purpose
GtH α -F	CCAACAACGAAATGGCACGA	实时荧光定量 PCR Real-time PCR
GtH α -R	GCACCCAACGCACTGGAAGA	
LH β -F	GCTCTTTACTGCTGCCTTGT	
LH β -R	TTGTAGCTTGGGTCCCTTGGT	
FSH β -F	CTCGCCAACATCTCCATCT	
FSH β -R	AGGTAGGTGAAGTGGAGGT	
18S-F	CCTGAGAAACGGCTACCACATCC	内部控制 internal control
18S-R	CTCCAATAGCGTATACTAAAGTTGCT	

(3) 目的基因的定量。使用 Real-time PCR Master Mix 试剂盒对花鳊 18S、GtH α 、FSH β 、LH β 基因的 cDNA 进行定量。反应体系 10 μ L, 引物各 0.1 μ L, 模板 0.2 μ L, Mix 5 μ L, 加双蒸水补齐。反应程序: 95 °C 预变性 60 s, 95 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环。在每个循环内加入读板步骤, 总延伸结束后,

加入融解曲线的制备(65~95℃,每0.2℃读板1次)步骤。每个样品重复3次,每次都用标准曲线定量出相对应的域值(Ct)和cDNA拷贝数。GtH α 、FSH β 和LH β 的mRNA相对表达量分别用GtH α 拷贝数/18S拷贝数、FSH β 拷贝数/18S拷贝数和LH β 拷贝数/18S拷贝数表示。

(4) 相关组织的观察方法。性腺以及消化道的组织学观察:将部分性腺、胃和肠道,分别固定于Bouin氏液中,经脱水、透明,石蜡包埋切片,H.E染色,然后光学电镜下观察并拍照,游标卡尺测量。肝脏的组织学观察:将肝脏固定于Carnoy液中,经脱水、透明,石蜡包埋切片,PAS染色,光学显微镜观察并拍照。卵的扫描电镜观察:用7.4磷酸缓冲液冲洗样品两次,加入适量4%戊二醛固定12h,丙酮梯度脱水后,用100%的醋酸异戊酯置换30min,在锡箔纸上自然干燥,再用E-1010离子溅射镀膜仪喷金,S-3000N型扫描电镜观察。

1.4 数据处理

实验所得数据均表示为平均数 \pm 标准差(mean \pm SD),采用SPSS软件统计包中的Duncan氏法检

验,当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结果

2.1 多次注射LHRH-A₂和鲤脑垂体匀浆诱导花鳉卵巢发育成熟

经过20周注射LHRH-A₂和鲤脑垂体匀浆(CPE)的15尾雌性花鳉经解剖观察,发现卵巢均有不同程度的发育,平均性腺成熟系数均显著高于对照组,表明注射外源激素具有良好的催熟作用,而5尾注射生理盐水的对照组雌性花鳉的卵巢发育均停留于II期初(图版-1,2),平均GSI为0.97%。根据它们性腺的发育状况可分为卵巢发育处于卵黄生成期(图版-3)的实验a组,共5尾,平均GSI为2.32%;卵巢发育处于成熟期(图版-4)的实验b组,共5尾,平均GSI为7.2%;卵巢发育完全成熟期(图版-5,6)的实验c组,共5尾,平均GSI为20.9%,平均怀卵量为1440000粒/尾。此外,对照组、实验a组、实验b组在实验结束后平均体重均比实验前降低,而实验c组鱼的体重却有所增加。

表2 人工诱导雌性花鳉性腺发育成熟的结果

Tab.2 Result of artificial induction of female marble eels

组号 groups	尾数 number	性腺发育状况 development stages	实验前后平均体重变化(+升;-降)(g) variations in body weight	平均性腺系数(%) mean GSI	成熟鱼平均怀卵量(粒/尾) mean brood amount
对照组	5	I~II期	-250	1.18 \pm 0.39	-
实验a组	5	III期	-311	2.32 \pm 1.50	-
实验b组	5	IV期	-247	7.20 \pm 2.86	-
实验c组	5	V期	+216	20.9 \pm 5.04	1440000

2.2 诱导卵巢发育成熟的花鳉催熟后成熟卵母细胞的光镜和扫描电镜观察

在注射17 α ,20 β -双羟孕酮(DHP)后12h卵巢发育成熟的花鳉自然排卵,在光镜下观察排出卵的形态,可分为3个时相:(1)卵呈半透明状态,细胞质中可观察到低密度的卵黄颗粒(图版-9);(2)卵黄颗粒聚集并增大,油滴同样增大并清晰可见(图版-10,11);(3)卵黄聚集成大的卵黄堆,多个油滴最后汇聚成一个(图版-12)。扫描电镜观察表明花鳉的成熟卵细胞呈圆球形(图版-7),直径为600~700 μ m,卵表面粗糙,呈现无规律的花纹,有受精孔(图版-8)。

2.3 卵巢发育不同时期脑垂体中GtH α 、LH β 和FSH β 的mRNA水平变化

用荧光实时定量PCR的方法测定了卵巢发

育成熟过程中GtH α 、LH β 和FSH β 的mRNA的表达(图1)。结果表明:对照组GtH α 、LH β 和FSH β 的mRNA表达均较低(GtH α 为0.65 \pm 0.44;FSH β 为0.0015 \pm 0.00056;LH β 为0.003 \pm 0.0014; $n=5$);当性腺发育至卵黄生成期(实验组a)时,3个亚基的表达量(GtH α 为4.14 \pm 0.42;FSH β 为0.53 \pm 0.18;LH β 为1.5 \pm 0.69; $n=5$)都明显高于对照组;当性腺发育到成熟阶段(实验组b和c),3个亚基的表达量不同程度降低(GtH α 为1.57 \pm 1.11;FSH β 为0.00089 \pm 0.00022;LH β 为0.088 \pm 0.63; $n=6$),其中LH β 的含量只比卵黄生成期略有下降,但仍然呈现高表达量,而FSH β 在卵巢发育成熟时的表达量明显下降,比对照组还要低。

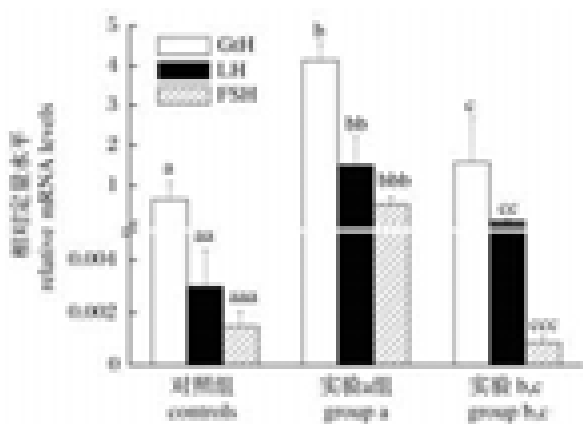


图1 相对定量测定垂体中GTH α ,FSH β 和LH β 亚基表达量的变化

a, b, c 表示显著性差异 ($P < 0.05$)。下同。

Fig.1 Real-time PCR analysis of relative mRNA levels of GTH α ,FSH β and LH β during ovarian development stage in females and testes development stage in males
a, b, c means the significant difference ($P < 0.05$). The same as the following.

2.4 卵巢发育不同时期血清中类固醇激素的含量变化

E₂的含量变化 如图2所示,对照组雌性花鳉血清中E₂的含量较高[含量为(48.79 ± 29.75)ng/mL, $n = 5$],卵巢发育到卵黄生成期的实验a组鱼,血清中E₂含量较对照组为低[含量为(9.81 ± 6.94)ng/mL, $n = 5$],卵巢发育到成熟期的实验b组鱼,血清中E₂的含量较实验组为低[含量为(4.14 ± 2.12)ng/mL, $n = 5$],卵巢发育完全成熟的实验c组鱼,血清中E₂含量最低[含量为(1.27 ± 0.95)ng/mL, $n = 5$]。结果表明,随着花鳉卵巢的发育成熟,血清中E₂的含量逐渐减少。

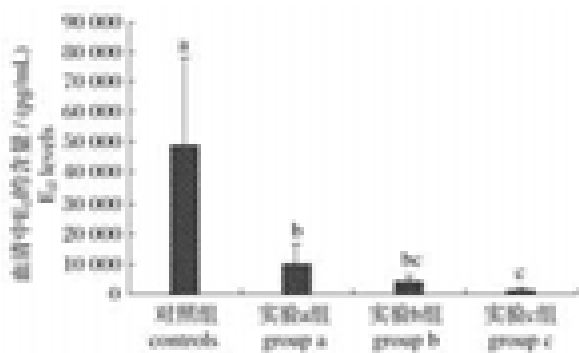


图2 不同发育阶段血清中雌二醇含量的变化
Fig.2 Variation in serum E₂ levels in different developmental stages

T的含量变化 如图3所示,对照组雌性花鳉血清中T含量极低,不在试剂盒灵敏度范围内,因此检测不到T的实际含量。卵巢发育到卵黄生成期的实验a组鱼,血清中T含量为(0.26 ± 0.33)ng/mL ($n = 5$),卵巢发育到成熟期的实验b组鱼,血清中T的含量较高[含量为(0.38 ± 0.29)ng/mL, $n = 5$],卵巢发育完全成熟的实验c组鱼,血清中T含量达到最高[含量为(1.43 ± 0.41)ng/mL, $n = 5$],结果表明,随着花鳉卵巢的发育成熟,血清中T的含量有增加的趋势。

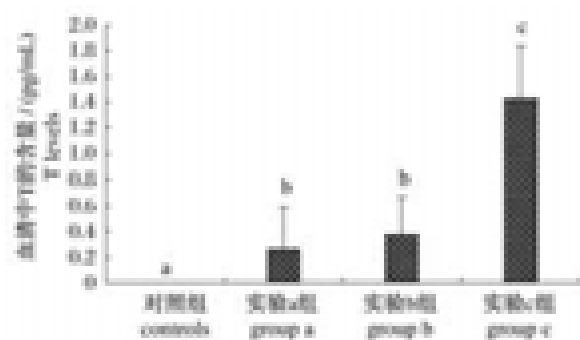


图3 不同发育阶段血清中睾酮含量的变化
Fig.3 Variation in serum T levels in different developmental stages

2.5 卵巢发育不同时期肝脏糖原染色的观察

肝脏糖原被特异性染色为红色,观察结果表明,未注射LHRH-A₂和鲤鱼脑垂体匀浆(CPE)的对照组,雌鱼肝脏糖原含量丰富,糖原骨架呈密集的网状结构,几乎看不到脂滴颗粒(图版-13)。性腺发育到Ⅲ期的实验a组鱼肝脏糖原含量减少,糖原骨架呈稀疏的网状结构,脂滴颗粒呈圆形或椭圆形,数量显著增加,肝脏内几乎充满了脂滴颗粒(图版-14)。性腺发育到Ⅳ期的实验b组鱼肝脏糖原继续减少,糖原骨架所形成的网状结构几乎消失,脂滴颗粒开始减少(图版-15)。性腺发育成熟的实验c组鱼肝脏糖原含量基本与实验b组保持一致,而脂滴颗粒数量大量减少(图版-16)。

2.6 卵巢发育不同时期消化道的变化

对照组平均消化道系数为1.242%,实验a组平均消化道系数和对照组几乎没有变化,为1.241%,实验b组平均消化道系数则极显著下降,为0.453%,实验c组平均消化道系数最低,仅为0.407%。结果表明,随着雌性花鳉卵巢的发育,消化道系数不断下降,卵巢发育至Ⅳ期时,消化道系数下降尤为明显。

对 4 组雌性花鳉消化道的胃肠进行组织切片观察以及游标卡尺测量 ($n=5$)。结果表明,花鳉的胃和肠道随着性腺系数的增加,呈现不同程度的退化(图 4 和图 5)。其中胃的退化最为明显,对照组花鳉的胃属 Y 形,胃盲囊体积大,实验 c 组鱼的胃则退化成细管状,粘膜层柱状上皮萎缩,嗜碱性分泌细胞体积变小,数量减少,除粘膜层外其它 3 层结构的厚度也明显减小(图版-17,18)。肠道壁和胃壁的结构相似,退化也较为明显,粘膜褶皱变短,分枝变少,肠道直径明显减小(图版-19,20)。

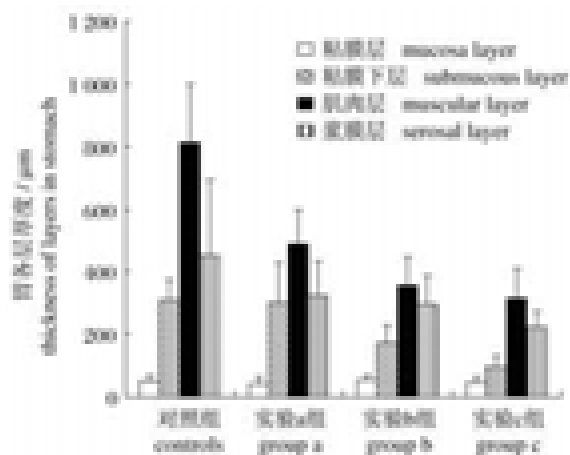


图 4 不同发育阶段,胃粘膜层,粘膜下层,肌肉层,浆膜层厚度的变化

Fig. 4 Variations in the thickness of mucosa layer, submucous layer, muscular layer and serosal layer in stomach in different developmental stages

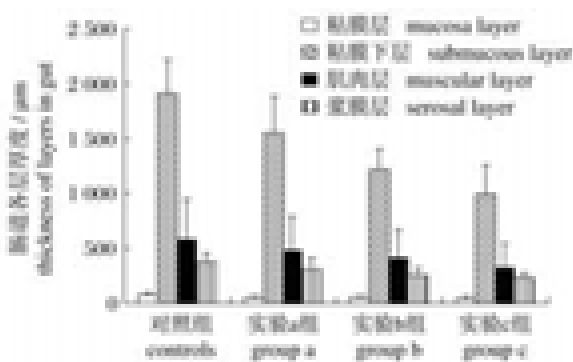


图 5 不同发育阶段,肠粘膜层,粘膜下层,肌肉层,浆膜层厚度的变化

Fig. 5 Variations in the thickness of mucosa layer, submucous layer, muscular layer and serosal layer in foregut in different developmental stages

3 讨论

本实验采用多次肌肉注射 LHRH-A₂ 和 CPE 混合物的方法,诱导雌性花鳉性腺发育成熟。在任意挑选的 15 尾实验组鱼中,5 尾卵巢发育完全成熟,5 尾卵巢发育至成熟期,5 尾卵巢发育至卵黄生成期,而对照组的性腺停留在未发育的 II 期,这表明注射的激素能诱导雌性花鳉性腺发育直到完全成熟,催熟效果良好。此外注射 DHP 可诱导卵巢发育成熟的花鳉自行排卵,与我们在日本鳉上的成功经验相一致^[14]。但为何实验组 15 尾花鳉卵巢的发育程度有所不同,其原因可能是:第一,与实验鱼的年龄不同有关(年龄分析待测定);第二,与实验鱼的个体差异有关,因为每尾鱼对激素的敏感性有所不同;第三,与催熟剂的种类和剂量有关,由于实验鱼之间的个体大小相差不大,在催熟剂的剂量上,我们没有差别对待,这很可能导致它们卵巢发育不同步。此外,我们对花鳉人工繁殖做了一些初步的探索,亦发现了一些问题。在此基础上,我们将总结和改正,继续展开深入的研究。

对硬骨鱼 GtH 的大量研究证明,两种 GtH 在性腺发育过程中扮演着不同的角色,其中 FSH 在卵巢发育早期起作用,主要是调节卵黄颗粒的形成;而 LH 则在卵巢发育晚期起作用,主要是促进卵巢的最后成熟^[15-18]。当卵巢处于 I ~ II 期时,花鳉脑垂体中 FSH β 和 LH β 的表达量很低,当卵巢发育至卵黄生成期时,FSH β 和 LH β 的表达量大幅度升高,当卵巢继续发育至成熟期时,FSH β 急剧下降,表达量几乎检测不到,而 LH β 虽略有下降,但表达量依然较高,明显高于对照组的表达量。这证明注射的催熟剂诱导花鳉脑垂体分泌产生的两种 GtH 分别在卵巢发育的不同时期起着刺激卵母细胞卵黄生成和卵母细胞最后成熟的作用。

本研究表明,随着性腺的不断发育,血清中 E₂ 的含量不断下降,成熟后达到最低点,与天然情况下硬骨鱼血清中 E₂ 含量的变化相一致。我们研究日本鳉性类固醇激素对卵巢发育的作用时发现 E₂ 虽然能促使肝脏合成卵黄蛋白原并释放到血液中,但不能使其渗入到卵母细胞内,而 T 能够使卵黄蛋白原迅速运输到卵巢并使其渗入细胞内^[19],这表明 E₂ 在卵细胞发育初期起主要作

用,而T在卵细胞发育的后期起主要作用,这可能是E₂含量随着卵细胞的发育而不断减少,T含量随着卵细胞发育上升的原因之一。

对照组鱼的肝细胞含有丰富的糖原,而实验组卵巢发育至卵黄生成期的肝糖原大幅度减少,脂肪颗粒大量增加,肝细胞中充满了脂肪颗粒,当卵巢发育至成熟期时,肝糖原含量随着卵巢的发育越来越少,然而在这过程中脂肪颗粒也随之减少。我们可以推断,在促性腺激素(GtH)的作用下,肝糖原被动地参与了性腺发育的过程,在卵巢进入生长期前糖原大量转化成脂肪颗粒,为卵巢进入生长期提供能量,当卵巢进入生长期后,由于卵巢发育的需要,肝细胞需大量合成卵黄蛋白原,从而需要能量导致脂肪颗粒的消耗。

本实验对花鳗鲡卵巢发育到不同时期时消化道组织学变化进行研究,得出随着卵巢的不断发育,消化道各部分均表现出不同程度的退化,胃的退化程度最为明显。此外,从消化道系数的变化可以看出当卵巢进入大生长期时消化道系数变化幅度最大,此期间消化道的退化最明显,推断这可能是由于卵巢进入大生长期发育所需要大量能量导致的。

参考文献:

- [1] Yamamoto K, Yamauchi K. Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in the aquarium[J]. Nature, 1974, 251: 220-222.
- [2] 王义强,赵长春,施正峰,等. 河鳗人工繁殖的初步研究[J]. 水产学报, 1980, 4(2): 147-158.
- [3] Tanaka H, Kagawa H, Ohta H. Production of leptocephali of Japanese eel (*Anguilla japonica*) in captivity [J]. Aquaculture, 2001, 201 (1-2): 55-60.
- [4] Okamura A, Yamada Y, Horita T, et al. Rearing eel leptocephali (*Anguilla japonica* Temminck & Schlegel) in a planktonkreisel [J]. Aquaculture Research, 2009, 40: 509-512.
- [5] Dufour S, le Belle N, Fontaine Y A, et al. Effects of steroid hormones on pituitary immunoreactive gonadotropin in European freshwater eel, *Anguilla anguilla* L. [J]. Gen Comp Endocrinol, 1983, 52 (2): 190-197.
- [6] Dufour S, le Belle N, Baloché S, et al. Positive feedback control by the gonads on gonadotropin (GtH) and gonadoliberin (GnRH) levels in experimentally matured female silver eels, *Anguilla anguilla* L. [J]. Fish Physiol Biochem, 1989, 7(1-6): 157-162.
- [7] 林浩然,张梅丽,张素敏,等. 鳗鲡繁殖生物学研究 IV. 人工催熟过程中下海鳗鲡的 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.
- [8] 汪小东,林浩然. 鳗鲡繁殖生物学研究: VI. 鳗鲡 17 α ,20 β -双羟孕酮的生成和作用[J]. 动物学报, 1999, 45(3): 317-322.
- [9] 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]. 北京:中国林业出版社, 1999: 42-47.
- [10] Lin H R, Xie G, Zhang L H, et al. Artificial induction of gonadal maturation and oovulation in the Japanese eel (*Anguilla japonica*) [J]. Bull Fr Pêche Piscic, 1998, 349: 163-176.
- [11] 汪小东,谢刚,林浩然. 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浓度的影响[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 123-129.
- [12] 汪小东,林浩然. 鳗鲡繁殖生物学研究 IV: 鳗鲡 17 α ,20 β -双羟孕酮的生成和作用[J]. 动物学报, 1999, 45(3): 317-322.
- [13] 周雯伊,黄海,尹绍武,等. 人工诱导花鳗鲡的精巢发育成熟及其精子的生物学特性[J]. 水产学报, 2009, 33(1): 53-59.
- [14] Lin H R, Zhang M L, Zhang S M, et al. Stimulation of pituitary gonadotropin and ovarian development by chronic administration of testosterone in female Japanese silver eel, *Anguilla japonica* [J]. Aquaculture, 1991, 96(1): 87-95.
- [15] Weil C, Bougoussa-Houadec M, Gallais C, et al. Preliminary evidence suggesting variation of GtH I and GtH 2 mRNA levels at different stages of gonadal development in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. Gen Comp Endocrinol, 1995, 100(3): 327-333.
- [16] Sato N, Kawazoe I, Suzuki Y, et al. Time-course response of plasma testosterone and estradiol-17 β to salmon gonadotropin treatment in the Japanese eel during ovarian development [J]. Fish Sci, 2000, 66: 792-794.
- [17] Kajimura S, Yoshiura Y, Suzuki M, et al. Changes in the levels of mRNA coding for gonadotropin I β and II β subunits during vitellogenesis in the common Japanese conger *Conger myriaster* [J]. Fish Sci, 2001, 67: 1053-1062.

- [18] Suetake H, Okubo K, Sato N, *et al.* Differential expression of two gonadotropin (GTH) β subunit genes during ovarian maturation induced by repeated injection of salmon GTH in the Japanese eel *Anguilla japonica*[J]. *Fish Sci*,2002,68:290-298.
- [19] 林浩然,张梅丽,张素敏,等. 鳗鲡繁殖生物学研究 V. 性类固醇激素诱导雌鳗促性腺激素(GtH)分泌和卵巢发育的作用[J]. *水生生物学报*,1994,18(3):272-279.

Artificial induction maturation of marbled eel(*Anguilla marmorata*) and functions of related hormones and tissues

LIN Hao-ran^{1,2*}, QI Xin¹, ZHOU Wen-yi¹, YIN Shao-wu¹, HUANG Hai^{1,2},
ZHANG Yong², LIU Xiao-chun², CHEN Guo-hua¹

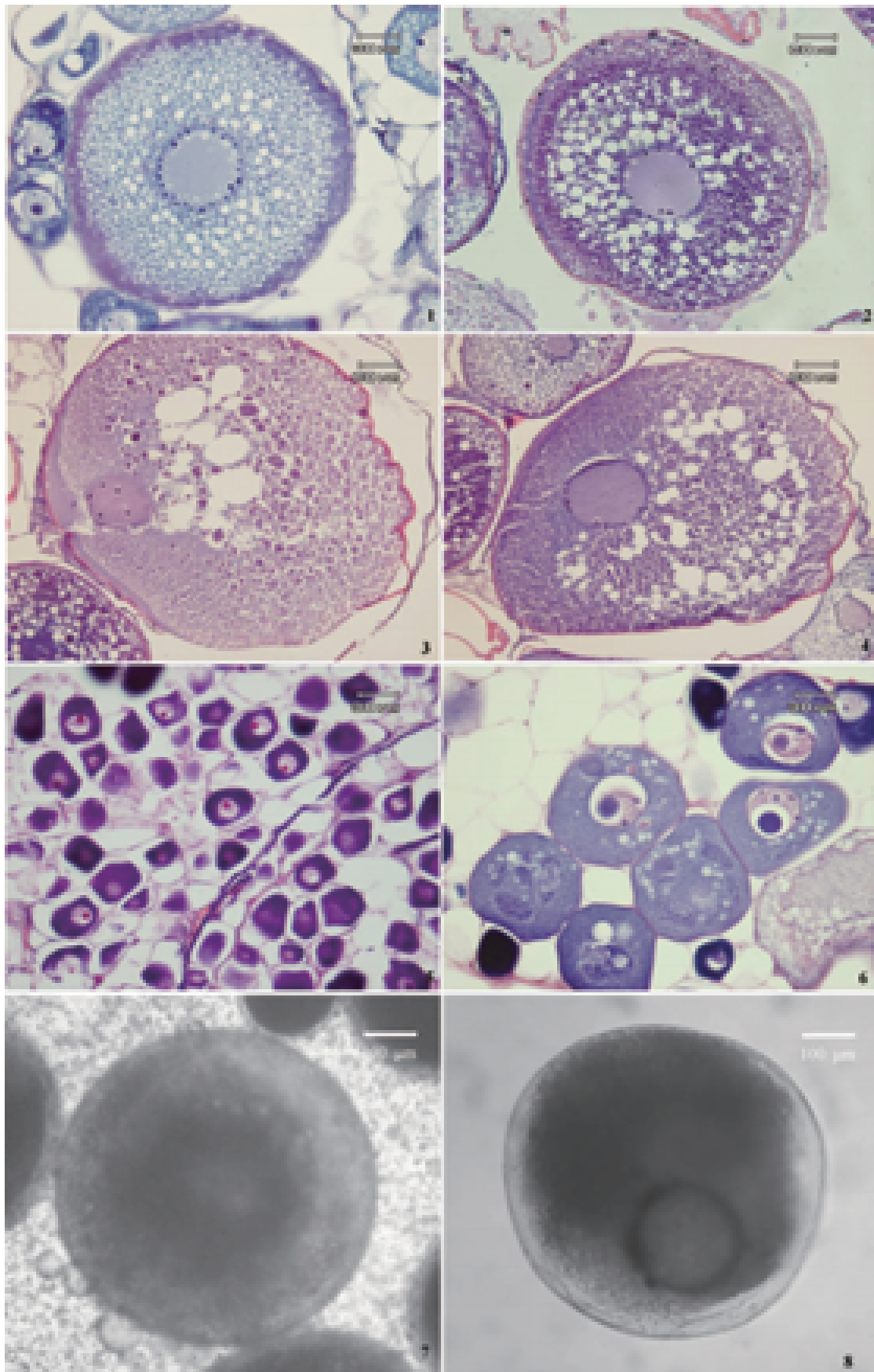
(1. Key Laboratory of Tropical Biology Resources, Ministry of Education, College of Ocean, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic Animals, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

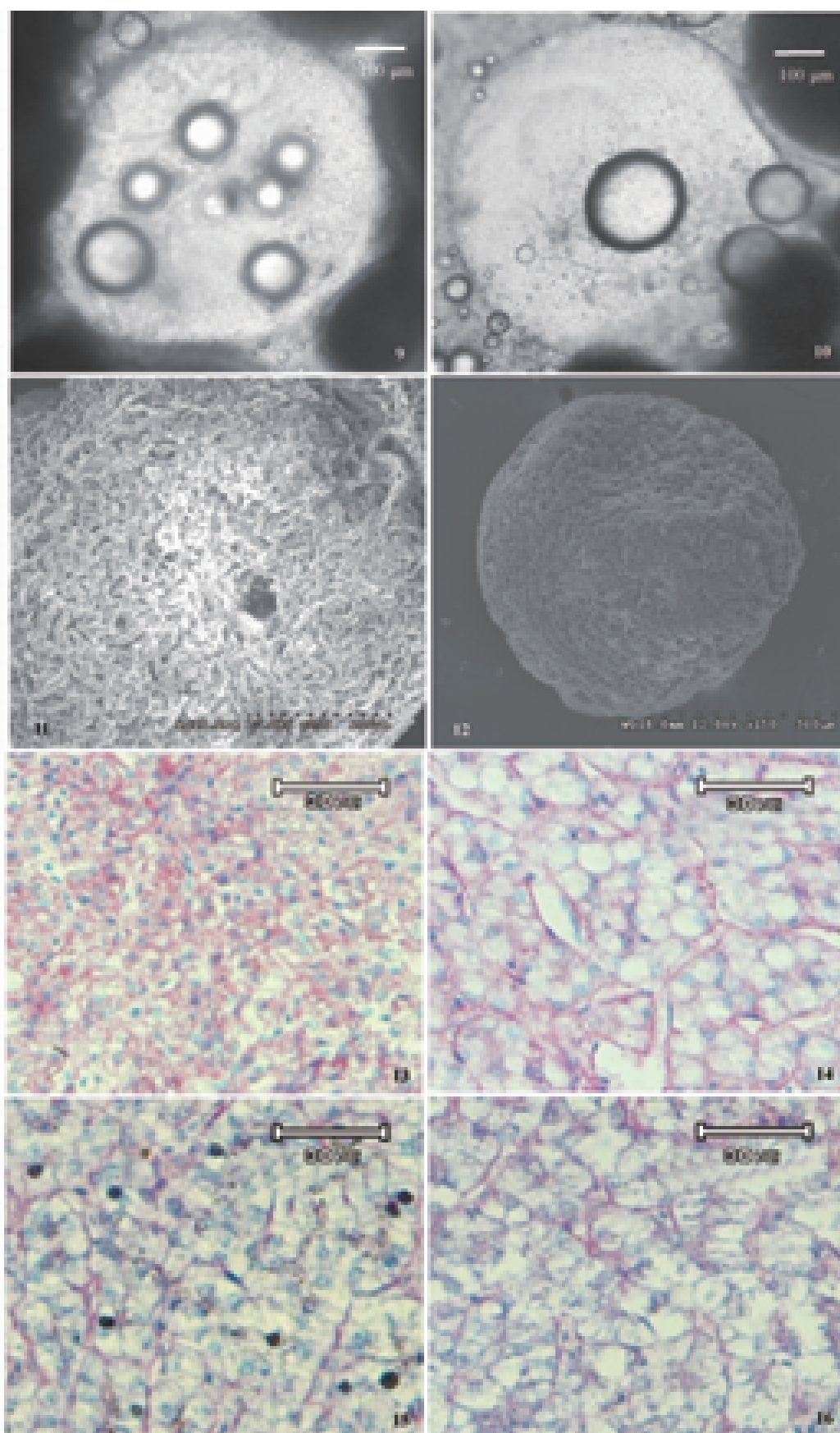
Abstract: In the present study, female marbled eel (*Anguilla marmorata*) were induced to develop ovarian maturation by repeated injection of carp pituitaries extract (CPE) and LHRH-A₂. Five in the fifteen randomly selected injected eels were matured, and were in the completely mature stage with the mean GSI of (20.9 ± 5.04)% (the max GSI was 27.3%); five were in the full-grown stage with the mean GSI of (7.2 ± 2.86)%; five were in the vitellogenic oocytes stage with mean GSI of (2.32 ± 1.5)%; while the controls were in the II stage with the mean GSI of (1.18 ± 0.39)%. The result showed that eels could be induced completely mature by the exogenous hormone management. mRNA levels of pituitary GtH subunits, serum steroid levels, and histology of hepar and alimentary canal of eels in different development stages were examined. Quantitative realtime PCR revealed that mRNA expression levels of GtH α , LH β and FSH β subunits increased with the oocytes development and then decreased after the maturation of ovary. The GtH α and LH β levels decreased with the maturation of ovary, but were still highly expressed. While the FSH β levels were hardly to be detected in the matured eels. Serum E₂ levels were high in the early stages and rapidly decreased with the development of the ovary; Serum T levels increased during the ovary development, especially at the mature stage. The PAS stain reaction of hepar showed that the glycogen decreased with the ovary development, and the lipid droplets increased significantly. This can be directly attributed to the fact that glycogen in hepatocytes was involved in metabolism of matter and energy in the development of ovary. The histology of stomach and intestine wall showed varying degrees of degeneration during the development of ovary.

Key words: marbled eel (*Anguilla marmorata*); artificially induced; ovary; gonadotrophin (GtH); sex steroid; hepar; alimentary canal

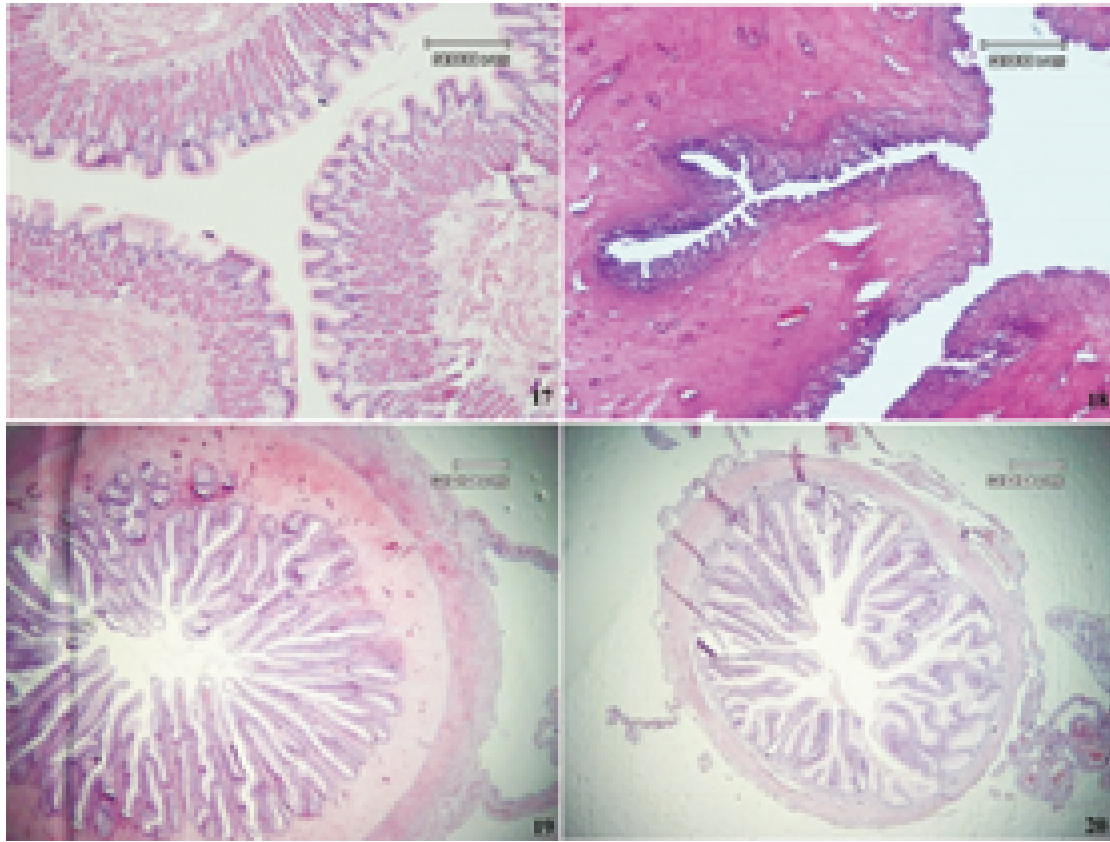
Corresponding author: LIN Hao-ran. E-mail: lsslhr@mail.sysu.edu.cn



图版 Plate



图版 Plate



图版 Plate

图版说明

1. 卵巢发育至Ⅲ期; 2. 卵巢发育至Ⅳ期; 3. 卵巢发育至Ⅴ期,核开始发生偏位; 4. 卵巢发育至Ⅴ期,核已经偏位至边缘,即将消失; 5. 处于Ⅰ~Ⅱ期的卵巢; 6. 卵巢发育至Ⅱ期末; 7. 光镜下成熟卵细胞水合作用Ⅰ期; 8. 光镜下成熟卵细胞水合作用Ⅱ期; 9. 光镜下成熟卵细胞水合作用Ⅲ期; 10. 光镜下成熟卵细胞水合作用Ⅳ期; 11. 成熟卵细胞扫描电镜观察入精空; 12. 成熟卵细胞扫描电镜观察其形态; 13. 卵巢处于Ⅱ期时,肝脏糖原染色观察; 14. 卵巢处于Ⅲ期时,肝脏糖原染色观察; 15. 卵巢处于Ⅳ期时,肝脏糖原染色观察; 16. 卵巢发育成熟时期,肝脏糖原染色观察; 17. 对照组胃壁横切面的组织学观察; 18. 卵巢发育成熟时期,胃壁横切面的组织学观察; 19. 对照组肠道壁横切面的组织学观察; 20. 卵巢发育成熟时期,肠道壁横切面的组织学观察。

Explanation of Plates

1. Ovarian development in stage III; 2. Ovarian development in stage IV; 3. Ovarian development at the migratory nucleus stages; 4. Ovarian section of a fish at the migratory nucleus stages; 5. Ovarian in stage I - II; 6. Ovarian in end of stage II; 7. Hydration of egg in stage I; 8. Hydration of egg in stage II; 9. Hydration of egg in stage III; 10. Hydration of egg in stage IV; 11. SEM of matured egg and sperm induction pore; 12. SEM of egg; 13. The PAS strain of fish in stage II; 14. The PAS strain of fish in stage III; 15. The PAS strain of fish in stage IV; 16. The PAS strain of matured fish; 17. Histology of stomach of controls; 18. Histology of stomach of matured fish; 19. Histology of gut of controls; 20. Histology of gut of matured fish.