

文章编号: 1000-0615(2016)08-1186-09

DOI: 10.11964/jfc.20151110146

注射LHRH-A₂对刀鲚的催产效果及其雌鱼血液生化指标的影响

徐钢春¹, 杜富宽², 黎燕², 张勇¹, 徐跑^{1,2*}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,

农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏无锡 214081)

摘要: 为了丰富刀鲚人工繁殖理论, 探明LHRH-A₂对刀鲚的催产效果及其雌鱼血液生化指标的影响, 本研究以2冬龄人工养殖刀鲚为研究对象, 通过注射LHRH-A₂进行人工催产, 并分析催产效果; 同时应用放射性免疫、化学发光等方法, 对人工催产过程中刀鲚雌鱼的血液生化指标进行了系统研究。结果显示, 按照雌鱼30 μg/kg、雄鱼减半的剂量注射LHRH-A₂, 刀鲚亲鱼死亡率为16.67%±3.34%; 存活刀鲚亲鱼群体中, 效应时间为21~24 h, 催产率为83.33%±3.34%, 受精率为75.06%±6.19%。注射催产素21 h内, 血浆中17β-雌二醇(17β-estradiol, E₂)、催乳素(prolactin)、甲状腺素(thyroxine, T₄)、皮质醇(cortisol)、总蛋白(total protein, TP)、乳酸(lactate)在人工催产过程中表现出先上升后下降的规律; 三碘甲腺原氨酸(three iodine thyroid, T₃)、甘油三酯(triglyceride, TG)、Cl⁻呈现持续下降趋势; 谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)、渗透压(osmotic pressure)、K⁺、Na⁺呈现持续上升的趋势。比较以上血浆指标在产卵组和未产卵组的实验结果, 产卵组形成高皮质醇、TP、TG、渗透压、Na⁺、K⁺的血浆环境和低E₂、催乳素、乳酸、T₄、T₃、Cl⁻、ALT、AST的血浆环境, 而未产卵组的这些指标与产卵组相反。结果表明, 人工催产过程对肝脏、肾脏等正常功能造成了影响, 从而抑制催产素LHRH-A₂对卵子的正向调控作用。本研究初步揭示了人工催产应激对刀鲚雌鱼成功排卵的影响机制, 为进一步优化刀鲚的规模化人工繁殖提供科学依据。

关键词: 刀鲚; LHRH-A₂; 催产效果; 催产应激; 血液生化指标; 雌鱼

中图分类号: Q 592.1

文献标志码: A

刀鲚(*Coilia nasus*), 俗称刀鱼, 隶属鲱形目(Clupeiformes)、鲱科(Engraulidae)、鲱属(*Coilia*), 是长江中珍稀名贵的生殖洄游性鱼类, 以鲜、嫩、美而闻名, 享有“长江三鲜”之首的美誉, 深受广大消费者青睐^[1]。近年来, 受水域生态环境恶化、过度捕捞和涉水工程建设等因素影响, 长江刀鲚洄游群体数量急剧下降, 2007年被列入首批“国家重点保护经济水生动植物资源名录”, 2012年长江刀鲚捕捞量降至历史

低点, 仅为57.5 t^[2]。然而, 刀鲚应激反应强烈, “出水即死”, 且存在繁殖群体性腺发育不同步等问题, 其人工育苗与养殖技术属世界难题^[3]。自2003年起, 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心成立攻关团队着手开展长江刀鲚的人工繁殖技术研究; 截至2014年, 取得了长江刀鲚种质资源、原种保存、人工驯养、全人工繁殖及生态养殖等阶段性成果^[4-11]。

目前, 如何实现在人工养殖条件下的生殖

收稿日期: 2015-11-06 修回日期: 2016-05-10

资助项目: 公益性行业(农业)科研专项(201203065); 江苏省科技成果转化专项(BA2015167); 江苏省水产三新工程重大专项(D2015-14)

通信作者: 徐跑, E-mail: xup@ffrc.cn

过程控制,是制约刀鲚工厂化、规模化繁养殖的技术瓶颈之一,而激素处理是当前公认调控鱼类繁殖成熟的最佳方法。尽管人工催产是刀鲚规模化获得苗种的重要方式,但因刀鲚应激反应强烈,每个环节的不当处理都将导致刀鲚亲鱼的严重损失,也致使该方法在刀鲚规模化繁养殖中应用受到极大限制。要改进长江刀鲚的人工催产产卵技术,首先要明确催产效果及其应激损伤的机理。本研究以2冬龄人工养殖的刀鲚为研究对象,应用放射性免疫、化学发光等方法,对人工催产过程中的血液生化指标进行了系统研究,以期初步揭示催产应激对成功排卵的影响机制,为进一步优化刀鲚的规模化人工繁殖提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验于2015年6月10—12日在中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴杞亭科研实验基地进行,实验水温22~25 °C。刀鲚亲鱼为人工繁育的F₁代,采用“鲢(*Cirrhinus molitorella*)鱼苗+细足米虾(*Caridina nilotica gracilipes*)”等系列活饵培育而成。选取体质量和体长相对一致的2冬龄刀鲚亲鱼为实验对象,其中雄鱼体长(26.35±2.10) cm、体质量(88.20±4.03) g;雌鱼体长(29.83±2.28) cm、体质量(112.40±8.05) g。雌雄鉴别方法:雄鱼个体稍小,轻轻挤压其腹部有白色精液流出;雌鱼个体相对较大,轮廓明显、腹部膨大。

1.2 实验设计

选取刀鲚雄性亲鱼和雌性亲鱼各90尾,分别置于3个8 m×4 m×2.5 m的网箱中养殖,每个网箱60尾刀鲚亲鱼(雌雄性比1:1)。实验网箱设置在67 m×50 m×3 m的原培育池中。正式实验前,夜晚利用光照吸引刀鲚聚集,分别从3个网箱中迅速取3尾雌鱼,置于麻醉剂中麻醉,作为对照;其余个体,按照雌鱼30 μg/kg、雄鱼减半的剂量注射促黄体素释放激素A₂(LHRH-A₂,宁波第二激素厂)。注射液为用0.75%的生理盐水配成15 μg/mL的LHRH-A₂注射液,每尾鱼的注射液体积小于0.5 mL。

激素注射后第0.5、8.0、16.0和21.0 h分别从每个网箱中取3尾雌鱼样品;同时根据前期预实验,在激素注射12 h后,每隔0.5 h用60目筛绢制作的网兜在表层轻轻捞卵检查产卵情况。

1.3 样品处理及检测

样品处理 样品鱼用70 mg/L的MS-222进行快速麻醉后,称量体质量、体长等基础数据,尾静脉采血,柠檬酸葡萄糖(ACD)抗凝,血样静置30 min后在4 °C条件下以5000 r/min离心10 min,所得血浆置于-20 °C冻存待测。

样品测定 血浆皮质醇、催乳素和17β-雌二醇(E₂)采用放射性免疫法测定(北京北方生物技术研究所,中国),样品及标准品加标记物抗体后37 °C温育[三碘甲腺原氨酸(T₃)温育60 min、甲状腺素(T₄) 45 min、E₂ 2 h、皮质醇1 h、催乳素20 h],加分离剂后,3800 r/min离心15 min,放射性免疫仪(西安核仪, xh6080, 中国)检测放射性强度,各指标标准范围分别为催乳素125~2000 μIU/mL、E₂ 0.1~1000 pg/mL、T₃ 0.5~8.0 ng/mL、T₄ 20~320 ng/mL,计算相应的结合率,绘制标准曲线,依据曲线计算待测物浓度。血糖、总蛋白(TP)、甘油三酯(TG)、谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)的测定采用化学发光法,以100 μL血浆为标准量,在美国贝克曼Cx-4型自动生化分析仪上测定,试剂盒来源于上海复旦张江生物医药股份有限公司。血浆渗透压以50 μL血浆为标准量,采用去离子水校对,在Gonotec冰点渗透压仪030(Osmomat 030, 德国)上测定。血浆乳酸、Na⁺、K⁺、Cl⁻浓度采用南京建成生物工程研究所的试剂盒进行测定。

数据处理 催产率(%)=去除死亡鱼后产卵雌刀鲚总数(尾)/去除死亡鱼后催产雌刀鲚总数(尾)×100

受精率(%)=抽检受精卵数(个)/抽检总卵数(个)×100

数据采用Excel 2007和SPASS 19.0软件进行统计分析,结果以平均值±标准差(mean±SD)表示。

2 结果

2.1 LHRH-A₂对刀鲚雌性亲鱼的催产效果

在水温22~25 °C、雌雄性比1:1的条件下,注射LHRH-A₂后,雌性刀鲚死亡率为16.67%±3.34%,催产效应时间为21~24 h,性腺由催产前的青色(IV期早期,图1-a)或灰色(IV期晚期,图1-b)转变成玉绿色(V期,图1-c),催产率为83.33%±3.34%,受精率达75.06%±6.19%。

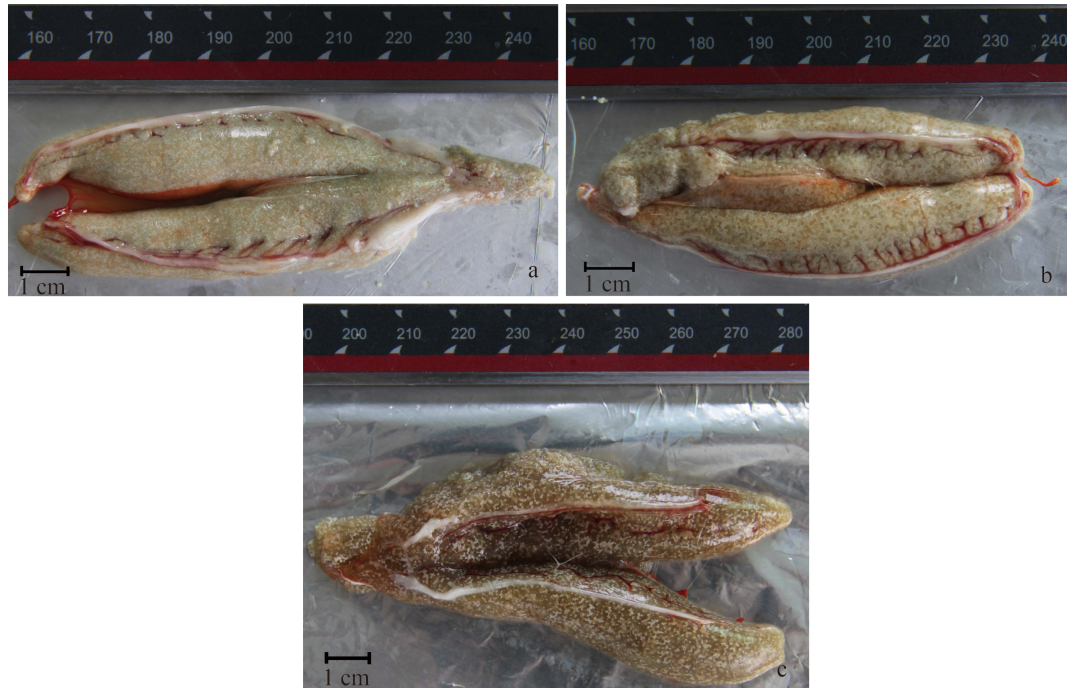


图1 人工催产刀鲚雌性亲鱼性腺变化

a、b. 激素注射前；c. 激素注射后

Fig. 1 Morphological changes of the ovaries in induced female *C. nasus* broodstock

a, b. ovary of *C. nasus* before LHRH-A₂ induction; c. ovary of *C. nasus* after LHRH-A₂ induction

2.2 人工催产对刀鲚血浆催乳素、E₂、T3及T4的影响

人工催产后，刀鲚雌鱼的E₂和催乳素表现出相似的应答模式，总体呈现先上升后下降的趋势。注射LHRH-A₂后0.5 h达到峰值，分别为(703.01±5.22) pg/mL和(184.59±9.89) μIU/mL，之后逐步下降，至注射LHRH-A₂ 21 h时，产卵组刀鲚的血浆E₂和催乳素水平降至最低，分别为(12.76±2.88) pg/mL和(57.65±8.67) μIU/mL，而此时未产卵组刀鲚的血浆E₂和催乳素水平明显较高，分别为(525.68±5.28) pg/mL和(160.74±8.33) μIU/mL。T3水平在注射LHRH-A₂后呈下降趋势，至21 h时的产卵组降到最低水平(0.67±0.22) ng/mL，而未产卵组依然维持在较高水平(7.24±1.19) ng/mL。T4呈现先上升后下降的趋势，同样21 h的产卵组的水平较低[(9.47±0.83) ng/mL]，而未产卵组较高[(23.16±1.79) ng/mL] (表1)。

2.3 人工催产对刀鲚应激指标及代谢的影响

注射LHRH-A₂的人工催产刀鲚在通过下丘脑—垂体—性腺轴(hypothalamic pituitary gonadal axis,

HPG)促熟性腺的同时也因操作应激反应而通过下丘脑—垂体—肾间组织轴(hypothalamic-pituitary-interrenal, HPI)的应答，最终会引发皮质醇的变化，进而皮质醇调节机体的代谢功能。皮质醇和血糖是指示应激的重要指标，均表现出先上升、后下降的变化趋势，在16 h后达到峰值，分别为(201.65±4.86) ng/mL、(59.31±2.82) mmol/L，21 h时产卵组的皮质醇和血糖均显著高于未产卵组($P<0.01$)，未产卵组的血糖值为(0.66±0.28) mmol/L，表现出严重的低血糖。TP表现出先升高、后降低的趋势，TG呈现下降趋势，产卵组的2个指标显著高于未产卵组($P<0.05$)(表2)。ALT和AST经人工催产应激后持续升高，但产卵组的ALT为(6.20±2.63) IU/L，未产卵组为(80.80±4.43) IU/L。乳酸则表现出先上升、后下降的趋势。产卵组的乳酸值为(4.21±0.35) mmol/L，未产卵组乳酸值(6.83±1.33) mmol/L。

2.4 人工催产应激对刀鲚血浆渗透压及Na⁺、K⁺和Cl⁻的影响

血浆渗透压及Na⁺、K⁺和Cl⁻是反映肾脏离子代谢功能的重要指标。人工催产后，血浆渗透

表 1 催产应激下刀鲚血浆催乳素、E₂、T₃及T₄的变化

Tab. 1 Changes of plasma prolactin, estradiol, three iodine thyroid and thyroxine concentration under spawning induction stress

激素注射时间 time post hormone injection	催乳素/(μ IU /mL) prolactin	17 β -雌二醇/(pg/mL) E ₂	三碘甲状腺原氨酸/(ng/mL) T ₃	甲状腺素/(ng/mL) T ₄
C	148.29 \pm 6.46	3673.72 \pm 4.63	20.31 \pm 0.07	6.55 \pm 2.66
注射后 0.5 h	184.59 \pm 9.89*	703.01 \pm 5.22*	13.63 \pm 1.22*	15.41 \pm 0.22*
注射后 8.0 h	154.41 \pm 3.92	57.41 \pm 2.44*	1.67 \pm 0.14*	4.38 \pm 0.28
注射后 16.0 h	129.87 \pm 6.54*	19.10 \pm 2.82*	0.82 \pm 0.16*	6.41 \pm 0.27
注射后 21-S	57.65 \pm 8.67*	12.76 \pm 2.88*	0.67 \pm 0.22*	9.47 \pm 0.83
注射后 21-U	160.74 \pm 8.33*	525.68 \pm 5.28*	7.24 \pm 1.19*	23.16 \pm 1.79*

注: *. 相对于对照组(C)有显著性差异($P < 0.05$); C组表示注射前, 依次为注射后0.5、8.0和16.0 h; 21-S表示注射后21 h产卵组, 21-U表示注射后21 h未产卵组。每个时间点 $n=9$, 下同

Notes: *. significant difference compared to the control ($P < 0.05$); the C group is the samples before induction, following is the samples post induction (0.5, 8.0, 16.0 h); 21-S is the spawning group post 21 h induction and 21-U is the unspawning group post 21 h induction. $n=9$ in the each time point, the same below

表 2 催产应激下刀鲚应激及代谢指标变化

Tab. 2 Changes of stress and metabolism indicators under spawning induction stress

激素注射时间 time post hormone injection	皮质醇/(ng/mL) cortisol	血糖/(mmol/L) glucose	总蛋白/(g/L) TP	甘油三酯/(mmol/L) TG	谷丙转氨酶/(IU/L) ALT	谷草转氨酶/(IU/L) AST	乳酸/(mmol/L) lactate
C	33.19 \pm 3.14	32.76 \pm 4.63	33.30 \pm 7.38	14.82 \pm 0.56	14.65 \pm 2.15	59.17 \pm 2.65	2.03 \pm 0.07
注射后 0.5 h	49.02 \pm 5.20*	22.46 \pm 5.22*	35.29 \pm 2.01	12.87 \pm 1.14*	30.93 \pm 4.09*	78.15 \pm 9.09*	4.13 \pm 0.93*
注射后 8.0 h	91.22 \pm 3.21*	39.12 \pm 2.44*	45.65 \pm 5.03*	12.84 \pm 1.91*	32.99 \pm 7.23*	164.24 \pm 8.56*	6.07 \pm 0.36*
注射后 16.0 h	201.65 \pm 4.86*	59.31 \pm 2.82*	36.34 \pm 2.79	6.56 \pm 0.36*	95.80 \pm 6.34*	627.13 \pm 4.63*	4.94 \pm 0.13*
注射后 21-S	139.18 \pm 8.86*	34.18 \pm 2.88	47.36 \pm 2.88*	7.58 \pm 1.21*	6.20 \pm 2.63*	298.58 \pm 6.99*	4.21 \pm 0.35*
注射后 21-U	76.29 \pm 2.05*	0.66 \pm 0.28*	19.39 \pm 2.90*	2.13 \pm 0.42*	80.80 \pm 4.43*	243.77 \pm 9.04*	6.83 \pm 1.33*

压、Na⁺、K⁺浓度均表现出上升趋势, 16 h时达到峰值, 分别为(0.56 \pm 0.05) Osmol/kg、(0.79 \pm 0.05)和(202.63 \pm 2.42) mmol/L。产卵组的渗透压、Na⁺、K⁺指标分别为(0.30 \pm 0.01) Osmol/kg、(0.47 \pm 0.03)和(119.45 \pm 2.88) mmol/L, 与对照组无显著差异($P > 0.05$); 而未产卵组的值显著低于对照组($P < 0.05$), 分别为(0.25 \pm 0.01) Osmol/kg、(0.03 \pm 0.01)和(55.32 \pm 2.90) mmol/L。Cl⁻表现出持续下降的趋势, 产卵组的Cl⁻浓度显著低于未产卵组($P < 0.05$)(表3)。

3 讨论

尽管本实验表明, 单独注射LHRH-A₂完全能成功催产长江刀鲚亲鱼, 但刀鲚的强烈应激反应给人工催产造成了巨大的困扰, 仍需优化刀鲚人工催产技术、降低人工催产引起的死

亡。鱼类的生殖是一个复杂的生物学过程, HPG轴是调控该过程的重要途径, HPI轴则主要调控应激反应, 而刀鲚的这2个轴是通过何种途径相互作用最终影响人工催产效应是本研究关注的重点。

3.1 HPG轴应答

HPG轴是鱼类最重要的生殖调控轴^[12]。自然环境中, 鱼类的感觉器官感受水温、光照、降雨等环境变化, 刺激下丘脑分泌促性腺激素释放激素(GnRH)和其他一些神经内分泌因子, 激发脑垂体分泌促性腺激素(GtH), 导致性腺产生性类固醇激素E₂, E₂是卵子发育和成熟过程中的重要效应分子^[13]。在卵黄发生前, E₂的作用是诱导成熟亲鱼卵细胞的发生和增殖; 在卵黄发生时诱发卵母细胞生长、卵黄积累。研究显示, 雌性团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)的卵黄由

表 3 催产应激下刀鲚血浆渗透压及 Na⁺、K⁺、Cl⁻浓度的变化Tab. 3 Changes of plasma osmotic pressure, Na⁺, K⁺ and Cl⁻ concentration under spawning induction stress

激素注射时间 time post hormone injection	渗透压/(Osmol/kg) osmotic pressure	K ⁺ /(mmol/L)	Na ⁺ /(mmol/L)	Cl ⁻ /(mmol/L)
C	0.29±0.02	0.32±0.15	115.61±5.30	70.93±4.05
注射后 0.5 h	0.28±0.01	0.58±0.06*	148.70±2.01*	20.81±4.07*
注射后 8.0 h	0.36±0.01*	0.57±0.01*	170.81±6.46*	8.37±2.32*
注射后 16.0 h	0.56±0.05*	0.79±0.05*	202.63±2.42*	12.78±2.80*
注射后 21-S	0.30±0.01	0.47±0.03	119.45±2.88*	7.78±0.34*
注射后 21-U	0.25±0.01*	0.03±0.01*	55.32±2.90*	23.72±1.40*

第Ⅱ期发育到第Ⅳ期,成熟系数逐渐增大,血清中E₂含量达高峰,而排卵前,血清中E₂下降到峰值的1/10。本研究中,刀鲚催产0.5 h后E₂达到峰值,之后迅速下降。人工催产后21 h,产卵组的E₂值约为峰值的1/70,而未产卵组E₂仍然维持在高水平。结果表明,高水平E₂可以促进卵子的发育,但会抑制排卵。

3.2 HPI轴应答

HPI轴是鱼类最重要的应激调控轴。人工催产应激刺激下丘脑释放促肾上腺皮质激素释放激素(CRH),刺激垂体分泌促肾上腺皮质激素(ACTH),诱导肾上腺释放皮质醇(糖皮质激素和盐皮质激素),该激素是应激反应的重要指示指标^[14]。糖皮质激素具有加速糖类和脂类代谢的作用,产卵组的皮质醇和血糖维持在较高水平,提供了抵抗应激所需的能量;而未产卵组的皮质醇水平较低,甚至出现了严重的低血糖,机体的这种状态,使得糖类、脂类的代谢不能快速完成,其产生的中间有毒代谢物迅速积累,会对细胞、组织造成损伤。未产卵组的高ALT、乳酸水平及低TP、TG水平都在一定程度上反映了其存在肝损伤^[15]。肝脏是机体代谢和能量产生的重要场所,肝损伤可能影响卵巢成熟及排卵活动。

盐皮质激素具有调控肾脏的渗透压和离子交换的功能^[16]。本研究中,产卵组在应激条件下保持血浆Na⁺、K⁺和渗透压与对照组无显著差异,而未产卵组则出现低钠、低钾和低渗透压的现象,这些指标表明组织中醛固酮增多,可能会诱发肾水肿、肾损伤等。因此,人工催产应激导致肾脏离子和渗透压调控异常,从而抑制卵子发育和排卵。

3.3 HPT轴应答

下丘脑—垂体—甲状腺轴(hypothalamic-pituitary-thyroid, HPT)对鱼类发育和生殖具有重要的调控作用^[17-19]。鱼脑主要通过神经内分泌调节促使垂体分泌促甲状腺激素(TSH),TSH进而作用于甲状腺促使其合成和分泌甲状腺激素(TH),TH主要包含T3和T4,T3是发挥其主要形式^[20-23]。研究表明,虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)血清TH水平与其卵黄沉积过程正相关^[24-25]。切除斑点猫鲨(*Scyliorhinus canicula*)甲状腺,可导致卵母细胞无卵黄沉积^[26]。由此可见,在雌鱼性腺发育过程中,TH对诱导卵黄发生及其在卵巢的沉积过程中具有重要作用。另外,在尖齿胡鲶(*Clarias gariepinus*)体内,外源添加TH可促使卵巢提前成熟;而抑制TH活性可对卵巢成熟造成抑制作用^[27]。因此,TH与卵母细胞的成熟密切相关。在本研究中,刀鲚血浆T3在催产后呈现下降趋势,催产成功的产卵组T3水平显著降低,而未产卵组的T3仍然维持在较高水平。T4水平表现为先上升,后下降的趋势。但与T3类似的是产卵组的水平显著低于未产卵组。由此可见,TH在刀鲚卵巢发育及协同卵黄沉积方面有重要作用,但是过高的TH又会抑制排卵。在红大麻哈鱼(*Oncorhynchus nerka*)^[28]、大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)^[29]、虹鳟^[30]、印度囊鳃鲷(*Heteropneustes fossilis*)^[31]等也有类似的结论。因此,高水平的T3和T4是刀鲚催产失败未产卵的重要原因。

有研究报道显示,TH不仅对生殖具有调控作用,同时对机体的糖代谢平衡起重要作用。肝脏是TH作用的主要靶器官,主要通过甲状腺素受体(TR)发挥生物学效应。高水平的TH促进

肝脏糖异生。由此可见, 下丘脑—垂体—甲状腺轴是横在HPG和HPI轴之间的桥梁, 通过这个桥梁, 形成了生殖与应激之间的相互作用。

综上, 下丘脑—垂体—性腺轴(HPG轴)是控制卵巢发育及排卵的主要途径, 刀鲚应激反应强烈, 人工催产势必引发应激反应。这种应激反应主要通过3条途径影响正常产卵: ①通过下丘脑—垂体—肾间组织轴(HPI轴)的应答调控, 释放糖皮质激素, 引发糖类和脂类的大量分解代谢, 中间有毒代谢物会对肝脏造成损伤, 影响卵巢发育及排卵所需的能量供应。②盐皮质激素引发的离子代谢和渗透压调控异常, 造成肾脏功能障碍, 影响机体离子内环境的稳定, 从

而会对机体的卵巢发育及排卵造成抑制作用。

③通过下丘脑—垂体—甲状腺轴(HPT轴)的调控释放TH, TH对早期卵巢发育及卵子成熟起到促进作用, 但在排卵阶段, 过高的TH会起到抑制作用(图2)。同时, TH含量的高低直接影响糖代谢, 进而影响应激反应。

因此, 人工催产过程中产生的应激反应会通过HPI轴、HPT轴影响肝脏的糖类代谢功能和肾脏的离子调控功能, 对HPG轴的性腺调控起到抑制作用。通过抗应激药物及适当的盐度调控, 降低应激损伤造成的影响, 同时配合注射适宜浓度的TH, 充分运用TH的正向作用, 才能提高催产的成功率并降低死亡率。

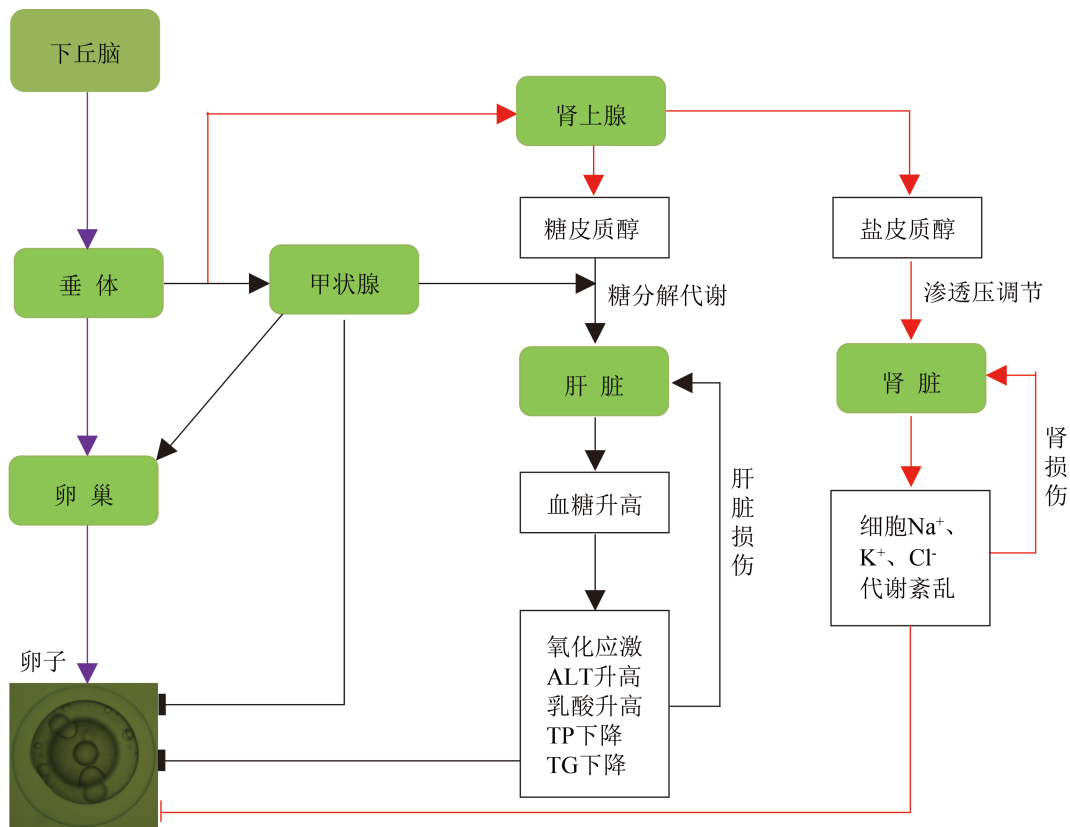


图 2 刀鲚催产应激对生殖的影响

Fig. 2 Effect of *C. nasus* spawning induction stress on reproduction

参考文献:

[1] 袁传宓, 林金榜, 秦安龄, 等. 关于我国鲚属鱼类分类的历史和现状—兼谈改造旧鱼类分类学的几点体会[J]. 南京大学学报(自然科学版), 1976(2): 1-12.
 Yuan C M, Lin J B, Qin A Q, *et al.* On the classification of the anchovies, *Coilia*, from the lower Yangtze River

and the southeast coast of China[J]. Journal of Nanjing University(Natural Sciences), 1976(2): 1-12 (in Chinese).
 [2] 刘凯, 段金荣, 徐东坡, 等. 长江口渔汛特征及捕捞量现状[J]. 生态学杂志, 2012, 31(12): 3138-3143.
 Liu K, Duan J R, Xu D P, *et al.* Present situation of *Coilia nasus* population features and yield in Yangtze

- River estuary waters in fishing season[J]. Chinese Journal of Ecology. 2012, 31(12): 3138-3143 (in Chinese).
- [3] Shi D, Gong D. Strategies of resource conservation for *Coilia ectenes* in the Yangtze Estuary[J]. Marine Science, 2003, 25: 96-97.
- [4] Xu G C, Tang X, Zhang C X, *et al.* First studies of embryonic and larval development of *Coilia nasus* (Engraulidae) under controlled conditions[J]. Aquaculture Research, 2011, 42(4):593-601.
- [5] 徐钢春, 万金娟, 顾若波, 等. 池塘养殖刀鲚卵巢发育的形态及组织学研究[J]. 中国水产科学, 2011, 18(3):537-546.
- Xu G C, Wan J J, Gu R B, *et al.* Morphological and histological studies on ovary development of *Coilia nasus* under artificial farming conditions[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(3): 537-546 (in Chinese).
- [6] 徐钢春, 聂志娟, 张呈祥, 等. 刀鲚精巢发育的组织学研究[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(2):247-252.
- Xu G C, Nie Z J, Zhang C X, *et al.* Histological studies on testis development of *Coilia nasus* under artificial farming conditions[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2012, 31(2): 247-252 (in Chinese).
- [7] 徐钢春, 徐跑, 顾若波, 等. 池养刀鲚(*Coilia nasus*) 鱼种的摄食与生长[J]. 生态学杂志, 2011, 30(9):2014-2018.
- Xu G C, Xu P, Gu R B, *et al.* Feeding habits and growth characteristics of pond-cultured *Coilia nasus* fingerlings[J]. Chinese Journal of Ecology, 2011, 30(9): 2014-2018 (in Chinese).
- [8] 徐钢春, 聂志娟, 薄其康, 等. 水温对刀鲚幼鱼耗氧率、窒息点、血糖及肌肝糖元指标的影响[J]. 生态学杂志, 2012, 31(12):3116-3120.
- Xu G C, Nie Z J, Bo Q K, *et al.* Effects of water temperature on oxygen consumption rate, asphyxiant point, blood glucose content, and muscle and liver glycogen content of juvenile *Coilia nasus* [J]. Chinese Journal of Ecology, 2012, 31(12): 3116-3120 (in Chinese).
- [9] 徐钢春, 聂志娟, 张守领, 等. 长江刀鲚寄生的异钩缺虫分子鉴定及形态学研究[J]. 水产学报, 2013, 37(7):1081-1086.
- Xu G C, Nie Z J, Zhang S L, *et al.* Morphological and molecular identification of *Heteromazocraes* parasitizes in *Coilia nasus* of the Yangtze River [J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(7): 1081-1086 (in Chinese).
- [10] 聂志娟, 徐钢春, 顾若波, 等. 刀鲚幼鱼消化系统的组织形态学结构[J]. 动物学杂志, 2012, 47(4): 104-113.
- Nie Z J, Xu G C, Gu R B, *et al.* Morphology and histology of the digestive system in the larvae of *Coilia nasus*[J]. Chinese Journal of Zoology, 2012, 47(4): 104-113 (in Chinese).
- [11] 魏广莲, 徐钢春, 顾若波, 等. 不同人工饲料对刀鲚幼鱼生长、血清生化指标及脂质代谢酶活性的影响[J]. 应用生态学报, 2013, 24(12):3567-3573.
- Wei G L, Xu G C, Gu R B, *et al.* Effects of diets on growth, serum biochemical indices and lipid metabolism in *Coilia nasus* fingerlings[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2013, 24(12):3567-3573 (in Chinese).
- [12] Liu X L, Yan A S. Recovery of earth-pond-reared *Pelteobagrus fulvidraco* from transport stress in acclimatization of laboratory system[J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(4): 495-501.
- [13] 林浩然. 鱼类促性腺激素分泌的调节机理和高效新型鱼类催产剂[J]. 生物科学信息, 1991, 3(1): 24-25.
- Lin H R. Fish regulation mechanism of gonadotropin secretion and efficient new fish oxytocin [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 1991, 3(1): 24-25 (in Chinese).
- [14] 林浩然. 激素和人工诱导鱼类繁殖[J]. 生物学通报, 1999, 34 (8): 1-3.
- Lin H R. Hormones and artificial induction of fish breeding [J]. Bulletin of Biology, 1999, 34 (8): 1-3 (in Chinese).
- [15] 王国强, 王雯. 应激反应对鱼类影响的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 37 (24): 11579-11580.
- Wang G Q, Wang W. Research progress in the effect of the stress response on fish[J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2009, 37 (24): 11579-11580 (in Chinese).
- [16] Du F K, Xu G C, Nie Z J, *et al.* Transcriptome analysis gene expression in the liver of *Coilia nasus* during the stress response[J]. BMC Genomics, 2014, 15: 558.
- [17] 胡应高, 伍春艳. 鱼类的应激反应[J]. 铜仁职业技术学院学报, 2003, 1 (2): 54-57.
- Hu Y G, Wu C Y. The stress response of fishes[J]. Journal of Tongren Vocational Institute, 2003, 1 (2): 54-

- 57 (in Chinese).
- [18] Gierach M, Gierach J J, Junik R. Insulin resistance and thyroid disorders[J]. *Endokrynologia Polska*, 2014, 65(1): 70-76.
- [19] Furuya F, Shimura H J, Yamashita S, *et al.* Liganded thyroid hormone receptor- α enhances proliferation of pancreatic β -cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285 (32): 24477-24486.
- [20] Blanchet E, Bertrand C, Annicotte J S, *et al.* Mitochondrial T3 receptor p43 regulates insulin secretion and glucose homeostasis[J]. *The FASEB Journal*, 2012, 26 (1): 40-50.
- [21] Jornayvaz F R, Lee H Y, Jurczak M J, *et al.* Thyroid hormone receptor- α gene knockout mice are protected from diet-induced hepatic insulin resistance[J]. *Endocrinology*, 2012, 153 (2): 583-591.
- [22] Feng X, Jiang Y, Meltzer P, *et al.* Thyroid hormone regulation of hepatic genes *in vivo* detected by complementary DNA microarray[J]. *Molecular Endocrinology*, 2009, 14(7): 947-955.
- [23] 郑茂, 叶山东. 甲状腺激素导致糖代谢异常机制的研究进展[J]. *临床与病理杂志*, 2015, 35 (2): 314-318.
Zheng M, Ye S D. The research progress of the effects of thyroid hormones on glucose metabolism[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2015, 35 (2): 314-318 (in Chinese).
- [24] Weber G M, Okimoto D K, Richman III N H, *et al.* Patterns of thyroxine and triiodothyronine in serum and follicle-bound oocytes of the tilapia, *Oreochromis mossambicus*, during oogenesis[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1992, 85: 392-404.
- [25] Raine J C, Leatherland J F. Trafficking of L-triiodo-
thyronine between ovarian fluid and oocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 136(2): 267-274.
- [26] Lewis M, Dodd J M. Proceedings: thyroid function and the ovary in the spotted dogfish, *Scyliorhinus canicula*[J]. *Journal of Endocrinology*, 1974, 63(2): 300-310.
- [27] Supriya A, Raghuvver K, Swapna I, *et al.* Thyroid hormone modulation of ovarian recrudescence of air-breathing catfish *Clarias gariepinus*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2005, 31(2-3): 267-270.
- [28] Biddiscombe S, Idler D R. Plasma levels of thyroid hormones in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) decrease before spawning[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1983, 52(3): 467-470.
- [29] Ueda H, Hiroi O, Hara A, *et al.* Changes in serum concentrations of steroid hormones, thyroxine and vitellogenin during spawning migration of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1984, 53(2): 203-211.
- [30] Cyr D G, Eales J G. *In vitro* effects of thyroid hormones on gonadotropin-induced estradiol-17 β secretion by ovarian follicles of rainbow trout, *Salmo gairdneri*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1988, 69(1): 80-87.
- [31] Biswas A, Kundu S, Roy S, *et al.* Thyroid hormone profile during annual reproductive cycle of diploid and triploid catfish, *Heteropneustes fossilis*(Bloch)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 147(2): 126-132.

Effects of LHRH-A₂ on induced spawning and responses of plasma biochemical indices of *Coilia nasus*

XU Gangchun¹, DU Fukuan², LI Yan², ZHANG Yong¹, XU Pao^{1,2*}

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: Effects of LHRH-A₂ on induced spawning and plasma biochemical indices responses of *Coilia nasus* were studied in order to accomplish the artificial breeding protocol of this species. LHRH-A₂ was used in those farm-raised, two-year-old (over 2 winters) *C. nasus* to analyze the function of induced spawning. Plasma biochemical indices of female *C. nasus* were determined using radioimmunoassay and chemiluminescent. Our results indicated that the average mortality rate of *C. nasus* was $16.67\% \pm 3.34\%$ while female fish were injected a dose of 30 μg LHRH-A₂ / kg body mass and male fish were injected with a dose of the half of the amount for female fish. The time of oxytocin induction in those survival fish ranged from 21 to 24 h, the average spawning rate was $83.33\% \pm 3.34\%$ and the average fertilization rate was $75.06\% \pm 6.19\%$. The concentration of plasma 17 β -estradiol (E₂), prolactin thyroxine (T₄), cortisol, total protein (TP) and lactic acid (lactate) increased initially and decreased thereafter while the contents of triiodothyronine (T₃), triglyceride (TG) and chloride ion (Cl⁻) decreased constantly and the contents of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), osmotic pressure, potassium (K⁺) and sodium (Na⁺) increased continuously within 21 hours after the LHRH-A₂ was used. The results also indicated that high cortisol, total protein, triglycerides, osmotic pressure, sodium ions, and potassium ions plasma environment, and a low 17 β - estradiol, prolactin, lactic acid, thyroxine, triiodothyronine, chloride, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase plasma environment occurred in those spawned *C. nasus*. The opposite results occurred in those not spawned individuals. In summary, the normal functions of liver and kidney of *C. nasus* were influenced by the manipulation of inducing spawning, which resulted in the fact that the regulation of oxytocin LHRH-A₂ to egg maturation was restricted. This preliminary study revealed the effect of LHRH-A₂ on induced spawning and responses of plasma biochemical indices of *C. nasus* and provided the basis for the commercially artificial breeding of *C. nasus*.

Key words: *Coilia nasus*; LHRH-A₂; spawning induction effect; spawning induction stress; blood biochemical indices; female fish

Corresponding author: XU Pao. E-mail: xup@ffrc.cn

Funding projects: National Special Research Fund for Non-Profit Sector (201203065); Special Fund of Jiangsu Province for the Transformation of Scientific and Technological Achievements (BA2015167); Three New Projects of Agricultural Aquaculture Program of Jiangsu Province (D2015-14)