

长吻鮠人工催产及脑垂体促性腺激素细胞的超微结构的变化

吴嘉敏 姜仁良 张继平
(上海水产大学渔业学院, 200090)

摘 要 通过对催产和未催产的长吻鮠脑垂体中腺垂体促性腺激素分泌细胞(GTH 细胞)的分泌活动分析,证实了用促黄体素释放激素类似物(LRH-A) 50 μ g/kg 加 DOM 5mg/kg 混合注射催产长吻鮠,能有效地促使 GTH 细胞分泌促性腺激素,诱导卵母细胞成熟和排卵,催产效果显著。超微结构的进一步观察,揭示了长吻鮠脑垂体 GTH 细胞中存在两种分泌颗粒,即分泌小球,直径 1200~2000nm,电子密度低;分泌颗粒直径 300~500nm,电子密度高。分泌小球释放与卵母细胞的发育成熟有关,分泌颗粒的释放则与排卵相关。

关键词 长吻鮠,促黄体素释放激素类似物,多巴胺抑制剂地欧酮,促性腺激素分泌细胞,超微结构

长吻鮠(*Leiocassis longirostris* G nther)属鲇形目,鮠科。俗称江团,鮠鱼。主要分布于长江干流各大河流中,很少进入湖泊,也能栖息于咸淡水区,是我国的名贵经济鱼类。由于长期的过度捕捞,使江河中长吻鮠的天然资源量急剧下降。因此开展长吻鮠的人工繁殖和养殖,加强其繁殖机理的基础研究,是尽快恢复长吻鮠资源的有效途径。

长吻鮠的人工繁殖工作已开展多年。姜仁良等[1990]、罗银辉和赵文英[1990]采用促黄体素释放激素类似物(LRH-A)和鲤鱼脑垂体进行混合注射取得较好的催产效果;而用 LRH-A 和绒毛膜促性腺激素(HCG)混合注射催产则基本无效[何福学等 1986]。由于鱼类脑垂体的来源困难,价格较高且催产不当易造成亲鱼死亡,故寻求一种经济、有效、安全的催产方法有其实际意义。鱼类繁殖内分泌生理研究表明,鱼类脑垂体促性腺激素分泌细胞(GTH cell)的分泌活动受下丘脑促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)和促性腺激素释放激素抑制因子(gonadotrophin release-inhibiting factor, GRIF)的双重调控[Peter 1983]。由下丘脑神经分泌细胞产生的多巴胺起着 GRIF 的作用,它既能直接抑制 GTH 细胞的分泌活动,也能抑制 GnRH 对脑垂体 GTH 细胞分泌的促进作用[Chang 等 1983、1984]。为此,本试验对长吻鮠使用 LRH-A 与多巴胺抑制剂地欧酮(domperidone, DOM)进行混合注射消除或抑制多巴胺对脑垂体 GTH 细胞分泌活动的抑制,进而增强 GnRH 促进 GTH 细胞分泌促性腺激素(GTH),诱导卵母细胞成熟和排卵并从脑垂体 GTH 分泌细胞超微结构比较观察中分析催产效果,力求对长吻鮠规模化生产提供一种经济有效的催产剂使用方法与理论依据。

上海市科委“八五”重点科研资助项目(长江口长吻鮠人工繁殖的研究),923213054号。

收稿日期:1999-08-24

1 材料与方法

1.1 亲鱼来源

试验用鱼为长江口捕获和池塘内培育的成熟亲鱼。用来催产的雌鱼选择生殖孔宽而圆,色泽红润,腹部膨大且松软富有弹性的个体;雄鱼则选择生殖乳突尖而长,其末端呈鲜红色的个体。

1.2 催产、授精和孵化

试验组采用 LRH- A 和 DOM 混合注射催产。催产前 15- 20 天,雌雄亲鱼注射催熟预备针,剂量 5 μ g LRH- A/尾。催产针分二次注射,针间距 10~ 14 小时。每次剂量均为 50 μ g LRH- A+ 5mg DOM/kg,雄鱼剂量减半,在雌鱼打第二次针时注射。对照组 iv: 不催产(本底),对照组 ②: 一次性注射催产针 50 μ g LRH- A/kg,对照组 ④: 一次性注射催产针 50 μ g LRH- A + 5 mg DOM/kg。水温 23~ 25 $^{\circ}$ C 时,效应时间为 19~ 22 小时。全部采用人工授精。成熟好的雌鱼,达到效应时间后,能挤出成熟的卵子。雄鱼的精巢结构为树枝状,不易挤出精液,采用杀鱼取精。将取出的精巢干燥状态下充分剪碎,用自行配置的稀释液稀释精子后,与卵子充分混合完成受精过程,随即迅速将受精卵粘附于“着卵板”,置微流水中孵化。孵化水温控制在(23 \pm 0.5) $^{\circ}$ C,溶氧量 7.0mg/L 以上,pH 8.0 左右。从受精到孵化,每天用解剖镜或显微镜观察胚胎的发育情况。在原肠中期计算受精率。

1.3 样品制备

剖取注射催产剂、注射后未产和注射后产卵的亲鱼脑垂体,时间为注射第二次催产针后 20 小时。

光镜观察样品的制备:将脑垂体整体固定于 Bouin 氏液中,按常规方法石蜡包埋,连续切片,切片厚度 6~ 8 μ m, Mallor 氏三色染色法染色。

透射电镜观察样品的制备:脑垂体经 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.2)漂洗,2.5% 戊二醛和 1% 锇酸固定,乙醇逐级脱水,环氧丙烷透明后,EP812 包埋。先用 LKB- 1 型超薄切片机制备 1 μ m 厚度的切片,以 1% 苯胺蓝染色,作嗜碱性分泌细胞定位。定位后的切片再制成 500~ 600nm 的超薄切片,经醋酸双氧铀和 Reynolds 氏柠檬酸铅液双染后,置于 JEM- 100B 型透射电镜观察及拍照。

2 结果

2.1 催产试验结果

1995、1996 年的 5~ 6 月共进行了二个周期的催产试验,共催产亲鱼 28 组,其中 22 组为催产试验组,6 组为对照组。试验组平均催产率为 68%,共获受精卵 4.5 万,孵化饲养后得 10~ 13cm 规格的鱼种 500 余尾。

2.2 脑垂体的一般结构和 GH、TSH、GTH 细胞的定位

脑垂体由神经垂体和腺垂体组成(图版- 1)。神经垂体与下丘脑相连,接受下丘脑对腺垂

体分泌机能的神经调控信息。腺垂体可分为前腺垂体(*pro-adenohypophysis*)、中腺垂体(*meso-adenohypophysis*)和后腺垂体(*meta-adenohypophysis*)。生殖季节,中腺垂体在腺垂体中所占比例将近一半。经 Mallory 氏三色染色,中腺垂体可被分辨出三种类型的细胞。在光镜下,区分这三种类型的细胞主要是依据其胞质颗粒不同的着色反应。被染成橙红色,体积较小,核偏向一端的近圆形细胞为生长激素分泌细胞(*growth hormone cell, GH*) (图版- 2),因其被染成红色,为嗜酸性细胞,且胞质内无糖蛋白分泌颗粒。体积较大,被染成蓝色的近圆形嗜碱性细胞为促甲状腺激素分泌细胞(*thyroid-stimulating hormone cell, TSH*) (图版- 3)。与 TSH 细胞大小相似,也被染成蓝色,但胞质中有透明空泡的圆形嗜碱性细胞为促性腺激素分泌细胞(*gonadotropic hormone cell, GTH*) (图版- 3)。通过电镜观察, GTH、GH、TSH 三种细胞的超微结构有很大的差异。GTH 细胞的胞质内具有大小明显不同的两种分泌颗粒,分泌小球(*secretory gloube*)电子密度较低,体积大,直径约为 1200~ 2000nm,分泌颗粒(*secretory granule*)电子密度较高,体积小,直径约为 300~ 500nm (图版- 4)。TSH 细胞的胞质中分泌颗粒较多,大小无明显差别,直径在 200~ 300nm,粗面内质网(RER)呈片状或泡状分散于胞质中(图版- 5)。GH 细胞胞质中分泌颗粒较多,大小差异不明显,直径约在 100~ 250nm,粗面内质网(RER)有规律地围绕细胞核呈环状排列(图版- 6)。

2.3 不同情况下中腺垂体 GTH 细胞的超微结构

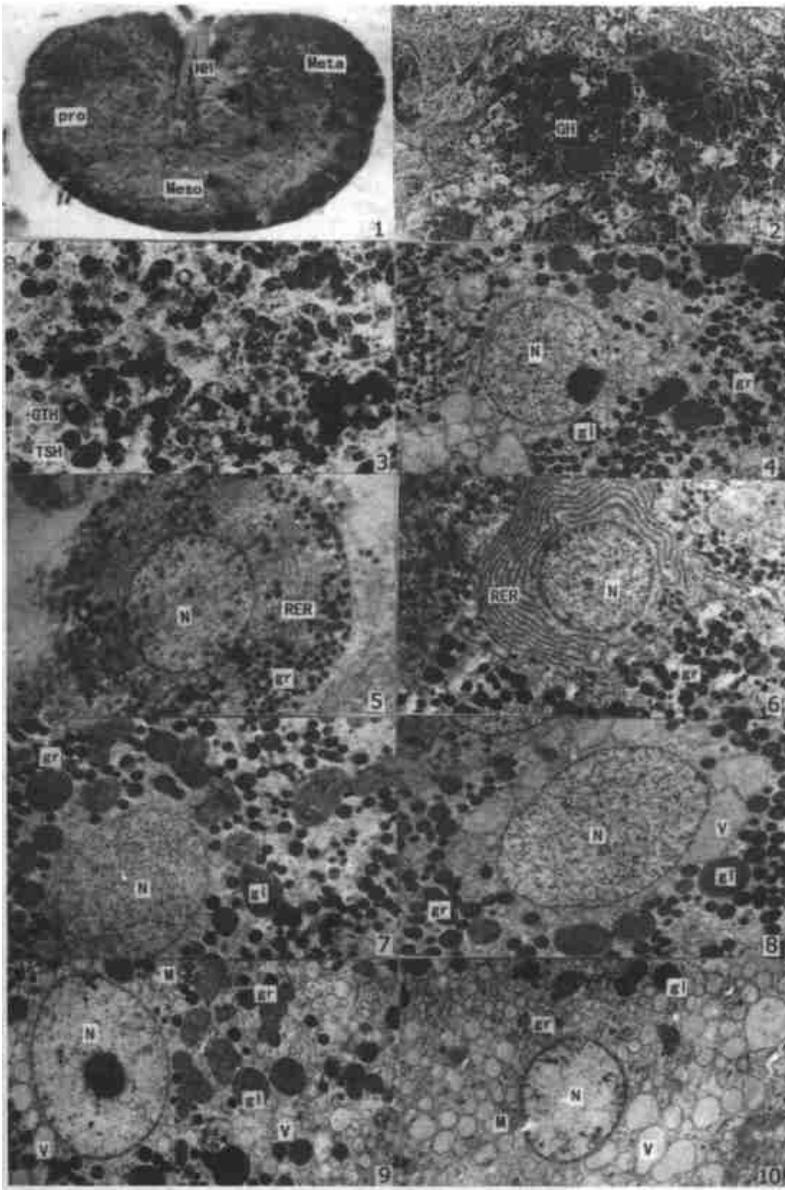
未经催产的成熟雌鱼 GTH 细胞的胞质中可见大量的两种分泌颗粒(图版- 7)。分泌小球直径在 1500~ 1700nm,部分出现相互融合,形成较大的不规则块状物。分泌颗粒直径在 300~ 500nm,未见颗粒排放而形成的空泡,线粒体也极少,说明细胞代谢活动微弱。注射预备针和催产针的未产卵雌鱼 GTH 细胞中分泌小球数量明显减少,出现大小不一或相互融合的大空泡(图版- 8)。仅注射催产针的对照组雌鱼 GTH 细胞中的分泌小球较多,部分形成不规则的块状物;分泌颗粒相对较少,形成许多小空泡。可见线粒体(图版- 9)。催产后产卵雌鱼 GTH 细胞分泌小球和分泌颗粒数量均大大减少,胞质中充满大小空泡。线粒体更加发达,数量明显增多,细胞代谢旺盛(图版- 10)。

3 讨论

3.1 关于催产剂的使用

本研究表明,长吻鮠对 LRH- A 具有良好的反应。低剂量的 LRH- A 可促进脑垂体 GTH 细胞的分泌活动。比较图版- 8、9 可知,注射低剂量 LRH- A 催熟针和正常剂量催产针的 GTH 细胞内的分泌小球活动频繁,分泌小球排放后数量减少。而直接注射催产针的 GTH 细胞分泌活动较弱,分泌小球排放少,数量相对较多。

虽然长吻鮠对 LRH- A 反应敏感,但单独使用,即使剂量较高,在短时间内也很难使 GTH 细胞分泌的促性腺激素达到使卵巢排卵的阈值。DOM 作为一种多巴胺抑制剂,可以抑制或消减 GRIF 对 GnRH 的影响,从而增强脑垂体 GTH 的分泌。本试验用外源 LRH- A 和 DOM 混合注射催产,从催产效果和脑垂体 GTH 分泌细胞超微结构的变化均表明有显著作用,增强对 GTH 细胞的分泌活动。同对照组 ㉔、㉕比较,取得了较好的催产效果,催产率达 68%。说明 DOM 能有效抑制下丘脑 GRIF 的分泌量或生物活性,从而相对提高了自身 GnRH 的作用效率。



图版 Plate

1. 长吻鲢脑垂体纵切面, $\times 10$; 2. 脑垂体中腺垂体局部, 示嗜酸性的生长激素分泌细胞(GH), $\times 134$; 3. 脑垂体中腺垂体局部, 示促性腺激素细胞(GTH)和促甲状腺激素分泌细胞(TSH), $\times 134$; 4. 示促性腺激素分泌细胞的细胞核、分泌小球和分泌颗粒, $\times 5\ 000$; 5. 示促甲状腺激素分泌细胞(TSH)的细胞核、分泌颗粒和粗面内质网, $\times 6\ 000$; 6. 示生长激素分泌细胞的细胞核、粗面内质网和分泌颗粒。粗面内质网围绕核成环状排列, $\times 6\ 000$; 7. 示未经催产的长吻鲢的促性腺激素分泌细胞。分泌小球和分泌颗粒均未排放, $\times 6\ 000$; 8. 示注射催熟针和催产针后未产卵的长吻鲢促性腺激素分泌细胞。分泌小球少而分泌颗粒多, $\times 6\ 000$; 9. 示未注射预备针而仅注射催产针长吻鲢的促性腺激素分泌细胞。分泌小球排放少, 分泌颗粒排放较多, $\times 5\ 000$; 10. 示产后的长吻鲢促性腺激素分泌细胞。胞质内出现大量的大小空泡而分泌小球和分泌颗粒极少, $\times 5\ 000$; NH: 神经垂体, pro: 示腺垂体前腺垂体, meso: 示中腺垂体, meta: 示后腺垂体, GH: 示生长激素分泌细胞, GTH: 示促性腺激素细胞, TSH: 示促甲状腺激素分泌细胞, N: 示细胞核, gl: 示分泌小球, gr: 示分泌颗粒, RER: 示粗面内质网, V: 示空泡, M: 示线粒体。

其他一些多巴胺抑制剂如 PIM (pimozide) 也具有 DOM 类似的这种生物活性[Sokolowska 等 1984, 1985, 林浩然等 1988]。何福学等[1985]、罗银辉和赵文英[1990]、姜仁良等[1990] 的相关研究也间接证明了这一点。他们均采用 LRH- A 和鲤科鱼类脑垂体浸出液混合注射, 取得较好的催产结果, 说明外源脑垂体可以弥补内源性 GTH 细胞分泌量的不足, 保证了促性腺激素达到卵巢的排卵阈值。理论上讲, DOM 与 LRH- A 混合催产比用鱼类脑垂体浸出液混合 LRH- A 更安全, 对亲鱼的损伤小。脑垂体浸出液注入鱼体后, 其巴器官是性腺, 不同发育程度的性腺接受外源激素的能力不同, 反应也不同, 剂量控制不当可能还会损伤性腺。DOM 作用的对象是 GRIF, 其生物学意义在于能间接提高外源 LRH- A 的作用效率。LRH- A 直接作用于垂体, 而非性腺, 它促使鱼自身脑垂体分泌内源的 GTH, 再作用于性腺, 因此效率更高, 更安全。当然, 这些推测还没有直接的实验证明, 有待今后进一步研究。

3.2 关于催产率和受精率

长江口野生长吻鲩由于年龄、营养积累、栖息生态环境和性腺发育程度等方面的差异, 人工繁殖具有一定的难度。催产方面, 从几年的情况看, 催产率相对较低, 一般在 60% 左右。若野生长吻鲩亲鱼经一段时间的蓄养, 或在池塘中完全由鱼苗培育成熟的长吻鲩, 均能取得很好的催产效果, 催产率可达 80% 以上[何福学等 1985]。野生长吻鲩人工繁殖的意义在于对长吻鲩亲鱼资源丰富, 尚无蓄养条件的地区, 可以直接利用天然亲鱼资源, 人工获得苗种, 达到增殖和保护资源的目的。从技术角度讲, 人工繁殖长吻鲩应选择池塘人工培育成熟的或捕捞后经一年以上培育的亲鱼为好。经人工培养的亲鱼, 性腺的营养物质可以得到充分的积累, 发育相对同步, 能得到很高的催产率, 甚至催产后可自行交配产卵。

与鲤科鱼类囊状的精巢结构不同, 长吻鲩精巢呈高度树状分枝。经研究, 高度分枝精巢的前 2/3 段呈乳白色, 能产生成熟的精子; 后 1/3 段呈紫红色, 不产生精子。自然排精时, 成熟精子必须通过这后 1/3 段方能排到体外。将这 1/3 段的精巢组织捣碎浸出液与精液混合, 发现没有激活精子的作用。目前对这段不产生精子的精巢结构的生理功能尚不十分清楚。这种高度分枝的精巢结构, 即使成熟较好的雄鱼也很难挤出精液进行人工授精, 故一般采取剖腹取出精巢, 捣碎经稀释后再行人工授精。鉴于这些因素, 长吻鲩人工繁殖卵子的受精率不很稳定, 一般在 30%~ 70%。研究中发现, 捣碎精巢组织的稀释液对激活延长精子的寿命, 提高对卵子的授精率具有显著作用。我们自行配置的精液稀释液可明显提高精子有效授精的时间, 从而提高了受精率。

3.3 长吻鲩中腺垂体 GTH 细胞的种类及分泌物的生理作用

长期以来, 对鱼类脑垂体中腺垂体 GTH 细胞种类因不同的研究对象和方法而得出不同的结论。我们对长吻鲩脑垂体超微结构的分析认为只存在一种 GTH 细胞, 但细胞中具大小两种分泌颗粒。长吻鲩 GTH 细胞的大小分泌颗粒可能对性腺的发育起不同的作用。繁殖期间分泌小球, 直径可达 1200~ 2000nm, 分泌小球分泌活动的强弱, 与卵母细胞的成熟有密切关系。注射催熟针(预备针) 和催产针后未产的雌鱼, 其 GTH 细胞中的分泌小球大量排放, 数量明显减少, 并伴随出现较多的大空泡, 但分泌颗粒活动微弱, 无外排现象(图版- 8)。分泌小球外排的生理意义在于使卵母细胞进一步发育成熟, 为随后的排卵奠定基础。由此也可以推断分泌小球分泌的激素成分相当于哺乳类的促卵泡成熟激素(follicle- stimulating hormone, FSH), 能促使卵母细胞的最后成熟。不打催熟针而直接注射催产针, 卵母细胞则不能完全成熟。实验

中表现为人工授精时因卵成熟差而导致受精率很低, 在 GTH 细胞的活动方面, 表现为分泌颗粒大量排放, 出现许多小空泡, 而分泌小球活动微弱, 极少有排放现象(图版- 9)。由此同样可以推测分泌颗粒的排放物具有促进排卵的作用, 可能相当于哺乳类的促黄体生成激素 (luteinizing hormone, LH) 的功能。不注射预备针和催产针对照组 iv 的长吻鲢不能排卵和进行人工授精, 其 GTH 细胞中的分泌小球和分泌颗粒也几乎无排放现象, 空泡极少(图版- 7); 而注射催产剂并产卵的长吻鲢, GTH 细胞中的分泌小球和分泌颗粒均大量排放, 出现许多大小空泡(图版- 10), 这都间接证明了上述对分泌小球和分泌颗粒排放物的生理作用的推断。

张继平现在广东省佛山科技学院动科系工作。

参 考 文 献

- 何福学, 苏良栋, 周贵荣等. 1986. 长吻鲢的蓄养繁殖试验研究. 淡水渔业, (1): 14~ 17
- 林浩然, 梁坚勇, 彭 纯等. 1988. 多巴胺拮抗物 Pimozide(PIM) 或排除剂 reserpine(RES) 和促黄体素释放激素类似物(LHRH-A) 诱导养殖鱼类促性腺激素分泌和排卵的研究. 水产学报, 12(2): 87~ 94
- 罗银辉, 赵文英. 1990. 长吻鲢内塘人工繁殖技术初步研究. 淡水渔业, (1): 41~ 43
- 姜仁良, 吴嘉敏, 郭梅初等. 1990. 长江口长吻鲢人工繁殖研究. 水产科技情报, (6): 160~ 165
- Chang J P, Peter R E, Nahorniak C S. 1983. Effects of dopamine on gonadotropin release in female goldfish, *Carassius auratus*. Neuroendocrinology, 36: 351~ 357
- Chang J P, Peter R E, Nahorniak C S, et al. 1984. Effect of catecholaminergic agonists and antagonists on serum gonadotropin concentration and ovulation in goldfish: evidence for specificity of dopamine inhibition of gonadotropin secretion. Gen. Comp. Endocrinol, 55: 351~ 360
- Peter R E. 1983. The brain and neurohormones in teleost reproduction. In "Fish Physiology". New York: Academic Press 99(A): 97~ 135
- Sokolowska M, Peter R E, Nahorniak C S, et al. 1984. Induction of ovulation in goldfish, *Carassius auratus*, by pimozide and analogues of LHRH. Aquaculture, 36: 71~ 83
- Sokolowska M. 1985. The effects of different dose of pimozide and [D-Ala 6, Pro 9- N- ethylamide] - LHRH (LHRH-A) on gonadotropin release and ovulation in female goldfish. Canad. J. Zool. 63: 1252~ 1256

ARTIFICIAL INDUCED SPAWNING OF *LEIOCASSIS LONGIROSTRIS* AND CHANGE OF ULTRASTRUCTURE OF HYPOPHYSIS GTH CELL

WU Jia-Min, JIANG Ren-Liang, ZHANG Ji-Ping
(Fisheries College, Shanghai Fisheries University, 200090)

ABSTRACT By the secretory action analysis of hypophysis gonadotropic hormone (GTH) cell of long snout catfish (*Leiocassis longirostris*) captured in the estuary of Changjiang River, it was verified that combinative injection of LRH-A 50ug/kg and DOM 50mg/kg could stimulate the secretion of GTH, induce the maturation and ovulation of oocyte. The results also indicate that there are two kinds of secretory granules in the GTH cell, one granule is bigger with diameter about 1 200-2 000nm and lower electron-density; the other one is smaller with diameter about 300- 500nm and higher electron-density. The release of bigger granule (secretory gloube) was relative to development and maturation of oocyte while the release of smaller granule (secretory granule) was relative to ovulation.

KEYWORDS *Leiocassis longirostris*, LRH-A, Domperidone(DOM), GTH cell, Ultrastructure