

研究简报

17 α -羟基-20 β -双羟孕酮诱导 泥鳅排卵的效应*

INDUCTIVE EFFECT OF 17 α -HYDROXY-20 β - DIHYDROPROGESTERONE ON OVULATION OF LOACH, *MISGURNUS ANGUILLICAUDATUS*(CANTOR)

曲维良 潘伟志 郭佳祥 郭继娥

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨)

Qu Weiliang, Pan Weizhi, Guo Jiaxiang and Guo Ji'e

(Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Harbin)

关键词 泥鳅, 17 α -羟基-20 β 双羟孕酮, 诱导排卵

KEYWORDS loach, 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone, induced ovulation

有关 17 α -羟基-20 β 双羟孕酮[17 α -Hydroxy-20 β -dihydroprogesterone(4 Pregnen-17 α -20 β diol-3one)](以下简称 17 α -20 β P)对鱼类排卵效应及其生殖机理作用的研究,自七十年代以来,国外已开展了这方面的工作。Schnetz, A. (1974), Jalabert, B. (1978) 和 Jalabert, B. *et al.* (1978) 曾论述过,用脑垂体促性腺激素(GTH)诱导鱼类卵细胞的成熟是通过中介物质性类固醇激素在起作用的。Jalabert, B. (1976) 叙述了用类固醇激素(17 α -20 β P)能诱发虹鳟鱼的卵细胞达到最终成熟。Montalembert, G. *et al.* (1978) 用 17 α -20 β P 给白斑狗鱼进行一次性注射,仅能诱导卵细胞成熟,而不能排卵或仅少部分排卵。Jalabert, B. *et al.* (1977) 在低温下先注入低剂量的鲤鱼脑垂体,而后再注射 17 α -20 β P,成功地诱导了鲤鱼产卵。

本试验是在 1984—1987 年间进行的,主要探讨在低温下用 17 α -20 β P 作为一种鱼类催产剂,并与其他药剂相结合进一步诱导鱼类排卵的有效性,旨在为我国北方寒冷地区提出一种鱼类催产的新途径。现将试验结果报道如下。

材料和方法

选用体型小、取材方便的泥鳅[*Misgurnus anguillicaudatus*(Cantor)]作为试验对象。试验鱼采自黑龙江省林甸县、泰康县和哈尔滨市郊区。泥鳅体重约 30—40 克。泥鳅自秋季运回本所后,置于 6—7°C 低温下暂养。用时放在水族箱内适应 24 小时。试验容器是上海花木公司生产的自动循环温控水族箱,容量 250 升。其内放置 4 个等大的铁丝网箱,使试验条件尽可能取得一致。室温 12—14°C。温控水族箱稍加调节即可使水温维持在稳定的低温条件。

* 本文承蒙中山大学林浩然教授审阅,谨此致谢。

收稿年月:1988年12月;1989年10月修改。

17 α -20 β P 系本所研制的粗制品。用 17 α -羟基孕酮作原料,用硼氢化钠还原 20-酮基获得成品。17 α -20 β P 呈白色结晶。事先将它溶解在纯酒精中,催情时用生理盐水稀释成乳白色液体。注射液允许有 20% 的酒精存在。LHRH-A, RES (多巴胺合成抑制剂) 和 HCG 等药剂均购于宁波激素厂。

雌泥鳅催情后,分置于水族箱内的各铁丝网箱中,在不配雄鱼和不加鱼巢的情况下,约经 24 小时后捞出检查,并轻轻挤压腹部。能顺利挤出淡黄色、半透明的卵粒,且挤出的卵数约占总卵量的 90% 以上者,可谓之有效排卵。如半产带血(或血块)和卵粒灰白者均为无效排卵。

采用卡方检验法分析各组排卵率的差异性。

试验结果

第一次试验 该试验主要是确定 17 α -20 β P 有效催产的最低剂量和单注射 17 α -20 β P 的效果。试验分七组(见表 1)。水温 19—20.5°C。各组均为二次注射。前五组第一次注入鲫鱼脑垂体(2.2 毫克/公斤体重),第二次分不同梯度注射 17 α -20 β P (分别为 20, 10, 5, 3 和 2.5 毫克/公斤体重)。结果是 1、2 和 3 组均能顺利排卵,卵粒淡黄半透明,这三组的排卵率均达 100%。第 4 组二次注入 17 α -20 β P(3.0 毫克/公斤体重),其排卵率为 71.43%。用卡方检验法分析表明,第 1, 2, 3 组排卵率与第 4 组的差异不显著($P > 0.05$);但为了能使试验得到满意的效果,该试验采用 5.0 毫克/公斤体重的剂量。第 5 组二次注入 17 α -20 β P 2.5 毫克/公斤体重,无排卵效应。第 6 组先注入生理盐水,再注入 17 α -20 β P 10.0 毫克/公斤体重,也无排卵效应。第 7 组注生理盐水无排卵效应。

表 1 不同浓度的 17 α -20 β P 的诱导泥鳅排卵效应

Table 1 Effect of 17 α -20 β P at different concentration on inducing the ovulation of loach

日期 (年、月、日)	组别	平均		第一次注射			第二次注射			排卵时间 (日、时、分)	排卵 水温 (°C)	排卵率 (%)	
		水温 (°C)	尾数	平均 体重 (克)	时 间 (日、时、 分)	鲫鱼脑 垂 体 (毫克/公 斤体重)	生理盐水 (毫升/公 斤体重)	时 间 (日、时、 分)	17 α -20 β P (毫克/公 斤体重)				生理盐 水(毫升 /公斤体 重)
1984.10.15	1	19.0	8	44.8	15日9:45	2.2		16日10:00	20.0		17日10:30	22.0	100*
1984.10.15	2	19.0	18	40.1	15日9:52	2.2		16日10:10	10.0		17日10:00	22.0	100*
1985.11.11	3	20.5	16	44.5	11日9:00	2.2		12日9:30	5.0		13日10:10	23.0	100*
1985.11.11	4	20.5	7	40.8	11日9:10	2.2		12日9:40	3.0		13日10:15	23.0	71.43
1985.11.11	5	20.5	8	43.0	11日9:15	2.2		12日9:47	2.5			23.0	0
1985.11.11	6	20.5	8	41.5	11日9:21		2.0	12日9:55	10.0			23.0	0
1985.11.11	7	20.5	8	39.5	11日9:33		2.0	12日10:05		2.0		23.0	0

* 排卵率显著高于 5、6、7 组($P < 0.01$)。

第二次试验 该次试验试图在低温下筛选出一种催产剂来代替脑垂体。试验分五组(表 2)。水温 12—12.8°C。第 1 组先注射脑垂体(2.2 毫克/公斤体重),注射 24 小时后再注入 17 α -20 β P (5.0 毫克/公斤体重),其排卵率为 100%。第 2 组第一次注射 HCG(500 万单位/公斤体重),第二次注入 17 α -20 β P 5.0 毫克/公斤体重,24 小时无反应,47 小时见排卵效应,但卵质不佳,卵粒灰白带血,排卵率为 61.54%。第 3 组先注射 LHRH-A(10.0 微克/公斤体重),后注入 17 α -20 β P 5.0 毫克/公斤体重,仅有部分泥鳅见排卵效应,多数鱼可挤出少量的卵粒,带血或有血块,排卵率仅为 15.33%。第 4 组分三次注射。前两次注射 LH-RH-A(10.0 微克/公斤体重),最后一次注入 17 α -20 β P (5.0 毫克/公斤体重),排卵率为 76.92%。第 1 组和第 4 组差异不显著($P > 0.05$)。因该组是三次注射,故一般在生产单位不多采用。第 5 组为对照试验组,两次均注入生理盐水,无排卵效应。

表 2 常规催产剂代替脑垂体诱导泥鳅排卵效应
 Table 2 Effect of routine in jection doses instead of the hypophysis
 of fish on inducing the ovulation of loach

日期(年、月、日)		1986.1.20	1986.1.20	1986.1.20	1986.1.20	1986.1.20
组 别		1	2	3	4	5
平均体重(克)		33.7	37.4	36.4	37.0	35.2
尾 数		12	13	13	13	10
平均水温(℃)		12.8	12.8	12.8	12.8	12.8
第 一 次 注 射	时间(日、时、分)	20日 10:20	20日 10:30	20日 10:40	20日 10:49	20日 11:05
	鲫鱼脑垂体(毫克/公斤体重)	2.2				
	HRH-A(微克/公斤体重)			10.0	10.0	
	HCG(国际单位/公斤体重)		500			
	生理盐水(毫升/公斤体重)					2.0
第 二 次 注 射	时间(日、时、分)	21日 9:30	21日 9:40	21日 9:50	21日 9:58	21日 10:15
	LHRH-A(微克/公斤体重)				10.0	
	17 α -20 β P(毫克/公斤体重)	5.0	5.0	5.0		
	生理盐水(毫升/公斤体重)					2.0
第 三 次 注 射	时间(日、时、分)				22日 11:00	22日 11:10
	17 α -20 β P(毫克/公斤体重)				5.0	
	生理盐水(毫升/公斤体重)					
排卵时间(日、时、分)		22日 11:00	23日 9:30	22日 15:30	23日 15:15	
排卵水温(℃)		12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
排卵率(%)		100*	61.54	15.38	76.92	0

* 排卵率显著高于第 3 和第 5 组($P < 0.01$),也显著高于第 2 组($P < 0.05$)。

第三次试验 该次试验探讨在低温下经纯化的 17 α -20 β P 的排卵效应及其他催产剂的催产效果。试验分六组。水温 14—14.5℃。第 1、2 组第一次注射脑垂体(2.5 毫克/公斤体重),第二次注入纯化的

17 α -20 β P (3.0 和 2.5 毫克/公斤体重)。第 1 组排卵率为 100%，第 2 组为 62.5%，后者无排卵效应的鱼所挤出的卵灰白带血。第 3、4、5 组第一次注射鲫鱼脑垂体，次日三组各注入 RES (3.0 毫克/公斤体重)+LHRH-A (20 微克/公斤体重)，和单注入 LHRH-A (20 微克/公斤体重) 以及 HCG(800 单位/公斤体重)。结果三组均无排卵效应，而泥鳅腹部比催情前反而变硬了。说明在低温下 RES (加抗氧化剂)、LHRH-A 和 HCG 难以起到催产的作用。

表 3 17 α -20 β P 和其他几种催产剂诱导泥鳅排卵效应

Table 3 Effect of 17 α -20 β P and the other doses on inducing the ovulation of loach

日期(年、月、日)	1987.11.7	1987.11.7	1987.11.7	1987.11.7	1987.11.7	1987.11.7
组 别	1	2	3	4	5	6
平均体重(克)	38.3	31.5	32.1	32.9	35.0	33.2
尾 数	8	8	8	8	8	8
水温(℃)	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0
第一次注射	时间(日、时、分)	7日 9:00	7日 14:00	7日 14:20	7日 14:30	7日 14:40
	鲫鱼脑垂体(毫克/公斤体重)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
	生理盐水(毫升/公斤体重)					
第二次注射	时间(日、时、分)	8日 15:00	8日 14:05	8日 14:12	8日 14:20	8日 14:30
	RES (毫克/公斤体重)			RES3.0	LHRH-A20.0	
	LHRH-A (微克/公斤体重)			LHRH-A20.0		
	17 α -20 β P (毫克/公斤体重)	3.0	2.5			
	HCG (国际单位/公斤体重)					800
	生理盐水(毫升/公斤体重)					
排卵时间(日、时、分)	9日 14:00	9日 14:20				
排卵水温(℃)	14.5	14.5	14.5	14.5	14.5	14.5
排卵率(%)	100*	62.5	0	0	0	0

注：排卵率与第 2 组比差异不显著($P>0.05$)，但显著高于第 3、4、5、6 组($P<0.01$)。

讨 论

1. 性类固醇激素催产的机制 Fostier, A. *et al.* (1973) 论述了类固醇激素有孕酮、17 α -双羟孕酮、20 β 双羟孕酮和 17 α -羟基-20 β 双羟孕酮，其中 17 α -20 β P 是诱导鲑鳟鱼类卵细胞成熟最有效的类固醇激素。林浩然(1982)，Jalabert, B. *et al.* (1972 和 1977) 叙述诱发卵细胞成熟，17 α -20 β P 起了主导作用，认为它可能是模拟卵细胞成熟的介质。赵维信(1987)认为在鱼类卵细胞最后成熟中，17 α -20 β P 形成高峰值，可能直接作用于卵细胞，致使细胞核消失。Jalabert, B. *et al.* (1977) 用放射免疫法测定了鲤鱼在注射脑垂体后，GTH 在血液中明显地升高，从 2ng/ml 能迅速升到 35ng/ml，在此情况下再注入 17 α -20 β P，能使鲤鱼顺利产卵。由此可以认为，在 17 α -20 β P 对卵细胞起作用之前，一定要借助于 GTH 的激发才能诱导排卵。本试验证明，单注 17 α -20 β P 的泥鳅卵巢充血，但不能排卵，既使能挤出几粒卵，也是灰白带血或血块。由此看出在排卵之前 GTH 的激发作用十分重要。

2. 在低温下 17 α -20 β P 的催产作用 用性类固醇激素催产的特点就在于在低温下能诱导卵细

胞成熟,并能达到排卵的目的。Jalabert, B. *et al.* (1977)在低温 13—15°C 注射 17 α -20 β P 能诱导鲤鱼产卵。本试验在低温 12—12.8°C 下先注射脑垂体再注入 17 α -20 β P, 结果能诱导泥鳅顺利排卵。而用 RES, LHRH-A 和 HCG 等催产剂则无排卵效应。说明在低温下只有补偿一定量的外源性类固醇激素, 卵细胞才能被激活达到成熟排卵。

3. 用常规催产剂代替鱼类脑下垂体 近几年鱼类脑垂体价格高昂,且来源缺乏。为了筛选一种催产剂来代替脑垂体,本试验采用了 LHRH-A、HCG 等常规催产剂,经试验排卵效果不佳,排卵率分别为 15.38% 和 61.54%,用 LHRH-A 连续两次注射,其结果虽有提高,但也未能达到最佳效果。Breton, B. *et al.* (1983)用 LHRH 或 LHRH-A 连续 2—3 次注射,再注入 17 α -20 β P, 仅能诱导鱼类部分产卵。因此,用其他催产剂代替脑垂体作催产,目前仍存在一定的问題,有待今后进一步研究。

4. 筛选和确定有效催产剂量 将 17 α -20 β P 分为不同梯度进行催产试验,结果证明 5.0 毫克/公斤体重为最低有效剂量,同时 10—20 毫克/公斤体重的剂量虽高出最低剂量 2—4 倍,也未见对鱼类排卵有何明显的不良影响。1987 年我们将 17 α -20 β P 进一步纯化,结果催产最低有效剂量可降到 3.0 毫克/公斤体重,与 Breton, B. *et al.* (1983), Jalabert, B. *et al.* (1977 和 1978 b)的用量相近。

我国北方春季经常出现寒流,家鱼人工繁殖常因此而受到侵袭和干扰,使催产效果受到影响。采用 17 α -20 β P 作催产剂,对高寒地区的鱼类早繁具有明显的稳定和促进作用。

参 考 文 献

- 林浩然, 1982. 硬骨鱼类促性腺激素的分泌及其调节机制。水生生物集刊, 7(4): 551—562。
- 赵维信, 1987. 虹鳟排卵前后血清中类固醇激素浓度变化的研究。水产学报, 11(3): 205—213。
- Breton, B. *et al.*, 1983. Effect of synthetic LH-RH and analog on plasma gonadotropin levels and maturation response to 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone. *Aquaculture*, 32: 105—114.
- Fostler, A. *et al.*, 1978. Action prédominante d'un dérivé hydroxylé de la progestérone sur la maturation *in Vitro* des ovocytes de la Truite Arc-en-ciel *Salmo gairdnerii*. *C. R. Acad. Sci. Paris sér. D.*, 277: 421—424.
- Jalabert, B., 1978. Production of fertilizable oocytes from follicles of rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) following *in Vitro* maturation and ovulation. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 18 (2B): 461—470.
- Jalabert, B., 1976. *In Vitro* oocyte maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) northern pike (*Esox lucius*) and goldfish (*Carassius auratus*). *J. Fish. Res. Board Can.*, 33: 974—988.
- Jalabert, B. *et al.*, 1972. Maturation et ovulation *in Vitro* des ovocytes de la Truite arc-en-ciel *Salmo gairdnerii*. *C. R. Acad. Sci. Paris. Sér. D.*, 275: 1189—1142.
- Jalabert, B. *et al.*, 1977. A new tool for induced spawning: the use of 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone to spawn carp at low temperature. *Aquaculture*, 10: 353—364.
- Jalabert, B. *et al.*, 1978a. Precocious induction of maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*): Problems when using 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 18 (14): 977—984.
- Jalabert B. *et al.*, 1978b. Precocious induction of oocyte maturation and ovulation in Coho Salmon (*Oncorhynchus Kisutch*). *I. Fish. Res. Board. Can.* 35: 1323—1429
- Montalembert, G. *et al.*, 1978. Precocious induction of maturation and ovulation in northern Pike (*Esox lucius*). *Ann Biol. Anim Bioch. Biophys.*, 18: 969—975.
- Schuetz, A. 1974. Role of hormones in oocyte maturation. *Biol. Reprod.*, 10: 159—178