

# 海藻酸钠-HCG 制剂对雌性金鱼 (*Carassius auratus*) 生殖激素水平的影响\*

侯志帅 温海深 尹相菡

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室 青岛 266003)

**摘要** 采用海藻酸钠(NaAlg)-HCG 缓释制剂进行激素埋植实验。实验开始时,雌性金鱼(*Carassius auratus*)卵母细胞处于III期。实验期间记录雌性金鱼性腺发育、放免(RIA)法测定血清性激素含量并且通过 RT-PCR 检测激素相关基因表达。结果表明,埋植 NaAlg-HCG 缓释激素后,雌性金鱼性成熟系数(GSI)在 6–21 d 显著高于对照组,血清睾酮(T)和雌二醇(E<sub>2</sub>)水平在 6–30 d 显著高于对照组;性腺芳香化酶基因(CYP19A 基因)和雌激素受体基因(ER $\alpha$  基因)mRNA 相对表达量分别在 2–21 d、14–30 d 内显著高于对照组,其性腺 GH 基因 mRNA 相对表达量变化不显著。研究结果显示,一次性埋植 NaAlg-HCG 缓释制剂,与雌性金鱼繁殖相关的生物学指标、激素水平、基因表达量较对照组产生明显变化,同时这种缓释制剂可以作为埋植激素的载体。

**关键词** 缓释制剂;海藻酸钠-HCG;性激素;基因 mRNA 表达

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)05-0033-07

随着水产养殖业的迅速发展,鱼类苗种需求量日益增加。由于鱼类的生殖活动受外部环境因素和神经内分泌的双重调节,因而生产中常常通过注射外源激素调节鱼类下丘脑-垂体-性腺轴得以实现生殖细胞的发生、性别分化和性腺发育成熟及其相应的繁殖活动,以解决鱼在人工养殖条件下性腺发育迟缓问题(温海深等, 2011; 邓岳松等, 1998)。只有血清激素浓度达到一定阈值后,激素才会发挥促进性腺发育的效果,否则血清药物水平的剧烈波动不仅起不到促进性腺发育的效果,反而会对有机体产生胁迫。传统的激素给予方式常常引起血清中激素浓度的大范围变化,注射后激素有效成分释放较快,激素在生物体局部浓度迅速升高,峰值后又较快下降。给予激素缓释制剂可以诱导因人工驯养而性腺发育不良的鱼类性成熟(温海深等, 2002),既能加快性腺发育,又能减少操作次数,减轻对鱼体的刺激,收到较好的催产效

果(Barbaro *et al*, 1997)。例如给予欧洲狼鲈(*Dicentrarchus labrax*)缓释激素,可以在 28–35 d 诱导其精液产量上升,对精子的密度、活力不产生影响,相比于传统激素 7 d 的作用时间,效果明显(Sorbera *et al*, 1996)。同样,前人关于雄性条纹狼鲈(*Morone saxatilis*)的实验,也论证了缓释激素能提高精液产量(Mylonas *et al*, 1997; Constantinos *et al*, 1998),同时,给予缓释激素可以使雌性金头鲷(*Sparus auratus*)每天产卵、排卵(Zohar *et al*, 1995),并且在卵子的数量、质量、受精率和孵化率等方面与正常状态下产生的卵子无显著差异(Barbaro *et al*, 1997)。此外,对于大西洋鲈(*Pleuronectes ferugineus*),南方鲷(*P. lethostigma*)的研究也得出了类似结果(Larsson *et al*, 1997; Berlinsky *et al*, 1996)。

人绒毛膜促性腺激素(HCG)是 1927 年从孕妇的尿液中提取的,与促黄体激素(LH)在生殖细胞受体内

\* 国家自然科学基金项目(41176122)和中国海洋大学国家大学生创新实验项目(1111010603)共同资助。侯志帅, E-mail: zhishuaihaida@163.com

通讯作者: 温海深, 教授, E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn

收稿日期: 2013-08-16, 收修改稿日期: 2014-01-14

作用相同,不同物种间不存在特异性(Ziecik *et al*, 2001; Rao *et al*, 2001)。近年来,随着重组 HCG 问世,其被广泛用于促进鱼类性腺发育成熟与催产排卵(Malison *et al*, 1998)。HCG 直接作用于鱼类性腺,诱发性腺产生类固醇激素,从而调节性腺成熟,促进卵母细胞生长发育或精细胞生长发育和精子形成(刘筠, 1993)。

海藻酸钠(NaAlg)是一种天然高分子,在褐藻中广泛存在,有较好的生物相容性,是制作缓释药物载体的理想材料(郑学芳等, 2010),但用作鱼类激素缓释载体的研究尚未见报道。鱼类性腺型芳香化酶(CYP19A)是雌激素合成的关键酶和限速酶(Guiguen *et al*, 1999),能催化雄激素(睾酮, T)转化为雌激素(雌二醇, E<sub>2</sub>),从而可控制多种鱼类的性别分化和性别转化(Nakamara *et al*, 1998)。雌激素通常以雌激素受体(ER $\alpha$ )为作用通路发挥作用。研究表明,鱼类的生长激素(GH)受到生殖活动的影响,如 GnRH 起着 GH 释放因子的作用,而这种作用有一定的种族特异性(林浩然等, 2000),与繁殖性能存在密切关系。

本研究以海藻酸钠为原材料制备海藻酸钠-人绒毛膜激素(NaAlg-HCG)缓释制剂,以繁殖内分泌模式动物金鱼[*Carassius auratus* (Linnaeus) var]为对象,观察 NaAlg-HCG 缓释制剂对雌性金鱼生殖内分泌机能的影响,为经济鱼类生殖调控与人工繁殖技术提供科学参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验于 2011 年 11–12 月进行,选用同批受精卵孵化的 1 龄雌性金鱼 90 尾,品种为镏金,实验期间金鱼均为第一次性成熟。暂养于规格为 40 cm×50 cm×35 cm 的玻璃水族箱内(每箱 15 尾,每两箱为 1 个实验组),每日投喂同种配合饲料至饱食,早晚各投喂 1 次。实验所用 NaAlg-HCG 缓释制剂由中国海洋大学海洋生命学院生物化学实验室制备,直径约为 50–150  $\mu\text{m}$ 。实验鱼暂养 14 d 后金鱼体长为(8.31±0.66) cm,体质量为(58.31±9.41) g。暂养及实验期间连续充气,全循环流水,光照周期为 12: 12。水温(21.21±1.59)°C, pH 为 7.67–8.32,硬度为 4.76 mmol/L,溶解氧为:(7.82±0.56) mg/L。实验开始时,雌性金鱼卵母细胞处在大生长期(III期),如图 1。

### 1.2 实验方法

1.2.1 实验分组及取样 实验为 3 组,分别为 A 组

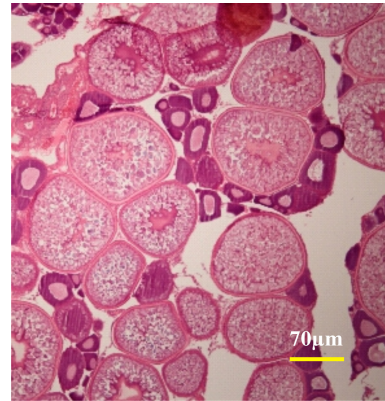


图 1 金鱼卵巢组织切片

Fig. 1 Histological sections of the ovary III of female Goldfish [*Carassius auratus* (Linnaeus) var]

(对照组): 一次性注射 0.7%生理盐水 200  $\mu\text{l}$ , 雌性金鱼 30 尾; B 组: NaAlg-HCG 缓释制剂组, 埋植 1% NaAlg-HCG 缓释制剂微球 200  $\mu\text{l}$  (含 HCG200IU), 雌性金鱼 30 尾; C 组: HCG 组, 一次性注射 1000 IU/L HCG 200  $\mu\text{l}$  (熊谱成, 2000; 李素梅, 1995), 雌性金鱼 30 尾。

取样时,记录金鱼的性腺重与体重,计算金鱼性成熟系数(Gonadosomatic index, GSI)。(金鱼性成熟系数=性腺重/鱼体全重)

对照组、HCG 组 通过注射器将生理盐水或 HCG 在实验鱼的胸鳍基部注射。NaAlg-HCG 缓释制剂组,用手术刀剖开腹膜 1.5 mm,埋植 NaAlg-HCG 缓释制剂,伤口消毒。

通过预实验,确定最佳实验时间为 30 d,并根据预实验采样结果确定在埋植第 0、2、6、14、21、30 天,雌性金鱼取样各 5 尾。取样时用 1/30000 浓度 MS-222 麻醉金鱼 10 min 后尾静脉取血,分离血清储存备用;解剖取出卵巢组织,部分置于波恩氏液中固定,性腺装入经 DEPC 处理的 EP 管后立即放入液氮,转移于-80°C 超低温冰箱中保存备用。

1.2.2 血清激素测定 实验中各处理组血清 T 和 E<sub>2</sub> 水平检测采用本实验室建立的 <sup>125</sup>I 标记的放射免疫测定法(RIA),试剂盒由天津九鼎医学生物有限公司生产,采用半微量法,加入样品的 <sup>125</sup>I 标记物、标准品浓度、第一和第二抗体剂量减半。以  $\gamma$  免疫计数器测量反应后的反应体系中的放射免疫强度(cpm),计算机直接输出激素浓度。

1.2.3 基因表达 组织总 RNA 的提取及 DNA 去除: 在第 0、2、6、14、21、30 天选择各处理组金鱼 3 尾,取性腺组织 100 mg(-80°C 保存),用 RNA iso Reagent 抽提总 RNA,通过 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA

完整性, 微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度。以 DNaseI 酶去除基因组 DNA。

RNA 反转录为 cDNA 根据 TaKaRa 公司的 M-MLV 反转录体系进行 cDNA 第一链的合成。合成的 cDNA 保存于 -20℃ 备用。

CYP19A 基因、ER $\alpha$  基因和 GH 基因 mRNA 在性腺中表达的检测: 取所需检测的组织样品 cDNA 1  $\mu$ l 作为模板进行 PCR 扩增。实验所需的 4 对 PCR 特异性引物由 Primer 5.0 软件设计, 18S rRNA 作为反应的内参照物。取 5  $\mu$ l 的 PCR 产物进行电泳。对电泳结果采用 Tanon GIS 凝胶图象处理系统进行分析。

**1.2.4 数据统计与分析** 利用 Duncan 氏多重比较对同一样品采集时间点的鱼样品组数据进行比较, 用 SPSS13.0 软件进行数据处理, 所得结果采用平均值  $\pm$  标准误差 (Mean  $\pm$  SD) 表示。

## 2 结果

### 2.1 NaAlg-HCG 缓释制剂对雌性金鱼性成熟系数 (GSI) 的影响

埋植 NaAlg-HCG 缓释制剂后, 雌性金鱼性成熟系数 (GSI) 变动如图 2 所示。NaAlg-HCG 缓释制剂组性成熟系数在埋植后 6-21 d 显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 埋植后第 6 天显著高于 HCG 注射组。第 30 天各处理组显著性差异消失。

### 2.2 NaAlg-HCG 缓释制剂对雌性金鱼血清激素水平的影响

#### 2.2.1 对金鱼血清睾酮 (T) 水平的影响

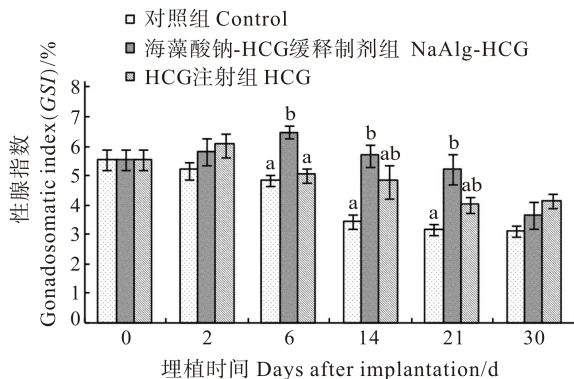


图 2 实验期间受试雌性金鱼性成熟系数 (GSI) 变动  
Fig. 2 The changes of gonadosomatic index of female goldfish during experiments

图 中所标注的不同字母为存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )  
Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ )

雌性金鱼血清 T 水平在 HCG 缓释制剂的作用下呈现规律性变动。在缓释制剂埋植后 6-30 d, NaAlg-HCG 缓释制剂组血清 T 水平显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 第 21、30 天显著高于 HCG 注射组 ( $P < 0.05$ ), 并且在第 21 天达到最高值。NaAlg-HCG 缓释制剂组、HCG 注射组血清 T 水平在实验期间随时间变化均呈现出先升后降的趋势, 并且缓释制剂埋植组的血清 T 水平下降趋势没有 HCG 注射组明显。实验结果如图 3 所示。

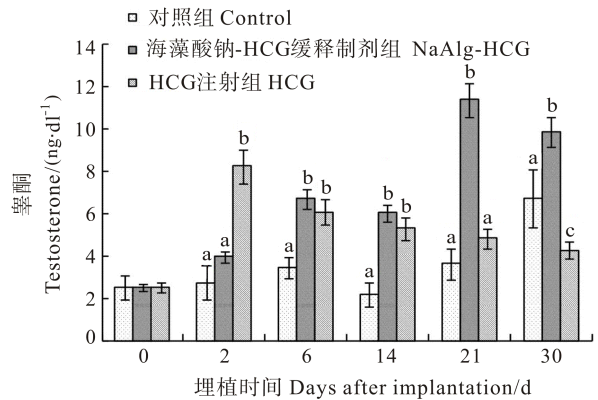


图 3 雌性金鱼血清睾酮 (T) 含量变动

Fig. 3 The levels of serum testosterone in female goldfish

图 中所标注的不同字母为存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )  
Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ )

#### 2.2.2 对雌性金鱼血清雌二醇 (E<sub>2</sub>) 水平的影响

NaAlg-HCG 缓释制剂组、HCG 注射组的血清 E<sub>2</sub> 水平在整个实验期间随时间的变化呈现先升后降的趋势。NaAlg-HCG 缓释制剂组在埋植后 6-30 d, 血清 E<sub>2</sub> 水平显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 在埋植后 6-21 d 显著高于 HCG 注射组 ( $P < 0.05$ ), 第 6 天出现最高值 (图 4)。

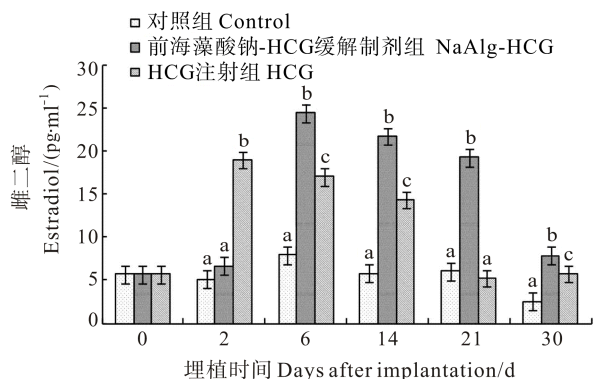


图 4 雌性金鱼雌二醇 (E<sub>2</sub>) 含量变动

Fig. 4 The levels of serum estradiol in female goldfish

图 中所标注的不同字母为存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )  
Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ )

## 2.3 NaAlg-HCG 缓释制剂对雌性金鱼性腺基因相对表达量的影响

**2.3.1 对雌性金鱼性腺 CYP19A 基因 mRNA 相对表达量的影响** NaAlg-HCG 缓释制剂组、HCG 注射组 CYP19A 基因 mRNA 相对表达量随时间变化呈现先升高后下降的趋势。其中, NaAlg-HCG 缓释制剂组在埋植后 6–30 d 显著高于对照组( $P<0.05$ ), 6–30 d 显著高于 HCG 注射组( $P<0.05$ ), 其相对表达量的最高值出现于缓释制剂埋植后第 14 d, 实验结果如图 5 所示。

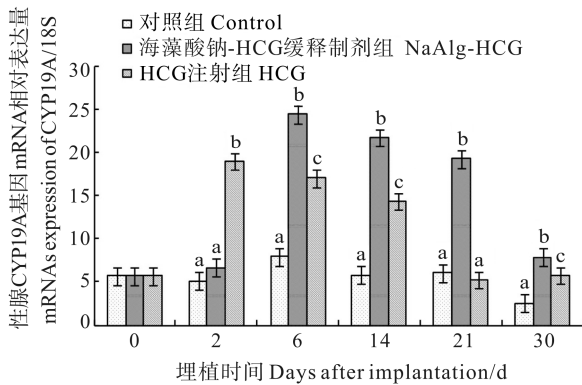


图 5 雌性金鱼 CYP19A 基因 mRNA 相对表达量  
Fig. 5 Relative expression level of CYP19A in female goldfish

图 5 中所标注的不同字母为存在显著性差异( $P<0.05$ )  
Different letters indicate significant difference ( $P<0.05$ )

**2.3.2 NaAlg-HCG 缓释制剂对雌性金鱼性腺 ER $\alpha$  基因 mRNA 相对表达量的影响** NaAlg-HCG 缓释制剂对雌性金鱼卵巢 ER $\alpha$  基因 mRNA 相对表达量的影响如图 6 所示, NaAlg-HCG 缓释制剂组、HCG 注射组随时间变化呈现先升高后下降的变化趋势。其中 NaAlg-HCG 缓释制剂组在埋植后第 14、30 天显著高于对照组( $P<0.05$ ), 在埋植后第 6 天显著低于 HCG 注射组( $P<0.05$ ), 在埋植后第 14、30 天显著高于 HCG 注射组( $P<0.05$ ), 其相对表达量最高值出现于缓释制剂埋植后第 14 天。

**2.3.3 NaAlg-HCG 缓释制剂对雌性金鱼性腺 GH 基因 mRNA 相对表达量的影响** 对雌性金鱼 GH 基因 mRNA 相对表达量的影响如图 7 所示。NaAlg-HCG 缓释制剂组、HCG 注射组 GH 基因 mRNA 相对表达量均呈现升高的变化趋势。其中, NaAlg-HCG 缓释制剂组 GH 基因 mRNA 相对表达量在埋植后第 2 天显著高于对照组和 HCG 注射组( $P<0.05$ ), 其最高值出现于埋植后第 30 天, HCG 注射组 GH 基因 mRNA 相对表

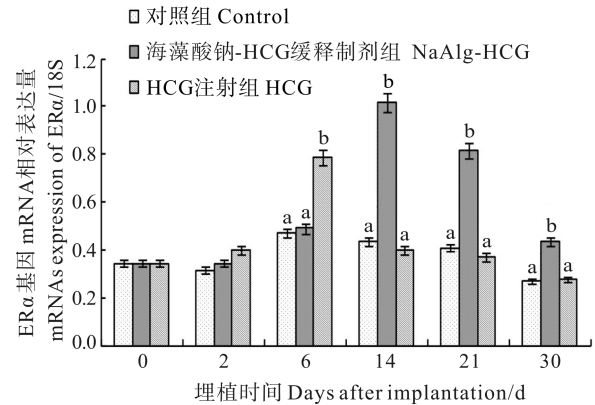


图 6 实验期间受试雌性金鱼 ER $\alpha$  基因 mRNA 相对表达量  
Fig. 6 Relative expression level of ER $\alpha$  mRNA in female goldfish during experiments

图 6 中所标注的不同字母为存在显著性差异( $P<0.05$ )  
Different letters indicate significant difference ( $P<0.05$ )

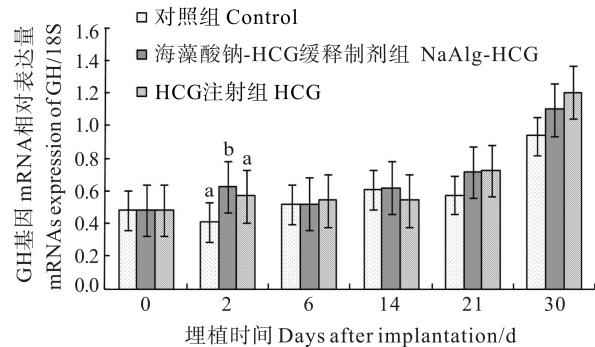


图 7 雌性金鱼 GH 基因 mRNA 相对表达量  
Fig. 7 Relative expression level of GH mRNA in female goldfish

图 7 中所标注的不同字母为存在显著性差异( $P<0.05$ )  
Different letters indicate significant difference ( $P<0.05$ )

达量最高值出现在注射后第 30 天。

## 3 讨论

按照缓释激素制作标准及鲤科鱼类单独使用 HCG 用量标准(熊谱成, 2000; 李素梅, 1995), 根据缓释载体直径的不同(50–150  $\mu\text{m}$ ), 为保证每尾实验鱼埋植相同数量的缓释载体与 HCG(200 IU), 综合考虑多次释放的原理, 确定缓释载体与 HCG 使用量为(10–20):1 (含 HCG 200 IU)。结果表明, 一次性埋植 NaAlg-HCG 缓释制剂, 能够通过正反馈途径调节鱼类性腺的发育、刺激鱼体产生生殖相关激素的分泌, 诱导生殖相关基因 mRNA 表达, 使金鱼 GSI、血清性激素等相关生理指标显著高于对照组。注射第 30 天性成熟系数、



CYP19A 基因表达呈现回落趋势。

使用 NaAlg-HCG 缓释激素的雌鱼在 2–30 d *GSI* 水平均高于对照组,其中 6–21 d 表现出显著差异。舒琥等(2005)曾提出缓释激素能显著提高血清促性腺激素(GTH)水平。林浩然(2011)指出 T 是  $E_2$  的前体物质,卵巢膜细胞经 GTH 作用产生大量睾酮,再经颗粒细胞层孵育,合成  $E_2$ 。本研究中,NaAlg-HCG 缓释激素处理后,雌性金鱼血清 T 在 6–30 d 显著高于对照组,21–30 d 显著高于 HCG 注射组,推测是 NaAlg-HCG 缓释激素能提高血清 GTH 水平,促进性腺发育,进而血清的 T 水平升高以便作为底物合成  $E_2$ ,与舒琥等(2005)的实验结果一致;值得注意的是,HCG 注射组受试的雌性金鱼第 2 天血清中的性激素 T、 $E_2$  剧增到最高值,NaAlg-HCG 缓释制剂组血清性激素上升趋势更为平缓,持续时间较长。

鱼类 CYP19A 能够催化雄激素(主要是 T)、合成雌激素(主要是  $E_2$ )。Tong 等(2003)、刘晓丽等(2011)证实 CYP19A 作为关键酶,其基因 mRNA 的表达量在精巢显著上升,能干扰精巢原有的性激素平衡,使内源雌激素合成增加。本研究中,埋植 NaAlg-HCG 缓释激素的雌鱼在 6–21 d 血清  $E_2$  水平及性腺 CYP19A mRNA 相对表达量显著高于对照组、14–21 d 显著高于 HCG 注射组,验证了 Tong 等(2003)的结论。雌激素受体(特别是  $ER\alpha$ )是雌激素的作用通路,雌激素与雌激素受体结合后通过反馈途径可以刺激生长等激素的分泌(郭军等,2011)。NaAlg-HCG 缓释激素处理的雌性金鱼 14–30 d 卵巢中雌激素受体 mRNA 相对表达量显著高于对照组,传统的 HCG 注射组仅在 14 d 显著高于对照组。鱼类的生长激素(GH)受促性腺激素分泌活动的影响(林浩然,2000),调控鱼类的生殖行为(林浩然,2011)。本研究中,雌性金鱼 NaAlg-HCG 缓释激素处理后,仅在第 6 d GH mRNA 相对表达量显著高于对照组和 HCG 注射组,其它采样时间点没有表现出差异,推测 GH 发挥相关的生物学作用是在光照、温度,外源激素等因素作用的综合效果(陈红等,2009)。

值得指出的是,在预实验中,当雌性金鱼卵巢细胞发育至 Ⅲ期时,雄性金鱼精巢细胞已进入 V 期,精子已充满精小叶间隙。本研究目的在于探究 NaAlg-HCG 缓释激素对金鱼性腺的发育影响,对于 V 时期的雄性金鱼精巢,以自然发育到成熟,不需要人为的干预。预实验数据表明,不论是激素水平(T、 $E_2$ ),还是生殖相关基因(CYP19A、 $ER\alpha$ )的相对表达,对照组与 NaAlg-HCG 缓释激素组没有显著差别。探究

NaAlg-HCG 缓释激素对雄性金鱼性腺的发育影响,需要在精巢细胞处于 III 时相时进行 NaAlg-HCG 缓释激素埋植。雌激素受体分为  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  3 种亚型,本研究主要是评估 NaAlg-HCG 缓释激素是否对金鱼性腺促熟起到积极影响,因而只选用  $ER\alpha$  这一个生理指标,能一定程度地反映 NaAlg-HCG 缓释激素效用。实验中非缓释的 HCG 注射组在 2–6 d 的时间中,能表现出与缓释制剂相同的调控机制,但是 14 d 后作用效果不及缓释制剂。其他鱼类研究也证实了这一点,传统的注射 HCG 诱导日本鳗鲡(*Anguila japonicus*)性腺发育成熟需要连续处理几周,采用缓释方法仅需 2–3 次(Ohta *et al.*, 1997),利用缓释激素对雌性日本鳗鲡催熟,*GSI* 水平平均增加 7.9%,实验证明对雄性日本鳗鲡也有促进性腺成熟效果(邓岳松等,2001)。这些结果说明,应用缓释制剂能够有效的诱导鱼类性腺发育成熟,效果稳定、持久。本研究首次应用海藻酸钠作为缓释载体制作 HCG 缓释制剂,仅一次埋植,21 d 内金鱼繁殖相关的生物学指标、激素水平、基因表达量较对照组产生明显变化,说明这种缓释制剂可以作为埋植激素的载体。

## 参 考 文 献

- 邓岳松, 梓荣, 林浩然, 等. 注射含 HCG 和 CPE 的 WOW 复乳诱导日本鳗鲡性腺发育成熟的研究. 中国水产科学, 2001, 8(2): 44–47
- 邓岳松. 鱼类激素埋植催熟技术. 水利渔业, 1998, (6): 13–14
- 刘晓丽, 汪奇, 贾林芝, 等. 壬基酚对斑马鱼精巢组织及性激素合成酶基因表达的影响. 环境科学学报, 2011, 31(11): 2523–2529
- 刘筠. 养殖鱼类繁殖生理学. 北京: 农业出版社, 1993, 61–62
- 李素梅. 实用养金鱼大全. 北京: 中国农业出版社, 1995, 18–36
- 陈红, 宋学茹, 岳天孚. 生长激素对生殖功能调节的研究进展. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2009, 28(1): 27–30
- 林浩然. 鱼类生理学. 中山大学出版社, 2011, 131–132
- 林浩然. 神经内分泌因子调控鱼类生殖和生长的相互作用. 动物学研究, 2000, 21 (1): 12–17
- 郑学芳, 刘纯, 廉琪, 等. 壳聚糖/海藻酸钠水凝胶的制备及其在药物控释中的应用. 河北科技师范学院学报, 2010, 24(1): 8–11
- 郭军, 章双杰, 汤青萍. 雌激素受体在垂体中的作用. 生命科学, 2011, 23(10): 976–979
- 温海深, 刘森, 祁保霞, 等. 雄性黄颡鱼芳香化酶基因 mRNA 在性成熟组织中表达分析. 渔业科学进展, 2011, 32(4): 26–33
- 温海深, 林浩然. 激素缓释制剂诱导海水养殖鱼类性腺发育成熟与生殖行为的研究进展. 中国水产科学, 2002, 9(2):

- 177–182
- 舒琥, 刘晓春, 林浩然. LHRH-A 缓释剂促进雄性赤点石斑鱼性类固醇激素分泌和精巢发育与排精的研究. 水产学报, 2005, 29(4): 433–440
- 熊谱成. 鱼类催产剂的合理使用. 农村实用科技, 2000(7): 17–17
- Berlinsky DL, King WV, Smith TIJ, *et al.* Induced ovulation of Southern flounder *Paralichthys lethostigma* using gonadotropin releasing hormone analogue implants. J World Aquacult Soc, 1996, 27: 143–152
- Barbaro A, Francescon A, Bozzato G, *et al.* Induction of spawning in gilthead seabream, *Sparus aurata* L. by long-acting GnRH agonist and its effects on egg quality and daily timing of spawning. Aquaculture, 1997, 154, 349–359
- Guiguen Y, Baroiller F, Ricordel M, *et al.* Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: The rain-bow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). Mol Reprod Dev, 1999, 54(2): 154–162
- Larsson DGJ, Mylonas CC, Zohar Y, *et al.* Gonadotropin releasing hormone-analogue GnRH-A advances ovulation and improves the reproductive performance of a cold-water batchspawning teleost, the yellowtail flounder *Pleuronectes ferrugineus*. Can J Aquat Fish Sci, 1997, 54: 1957–1964
- Malison A, Lynne, Procarione LS. Induction of Out-of-Season Spawning in Walleye (*Stizostedion vitreum*). Aquaculture, 1998, 163: 151–161
- Mylonas CC, Scott AP, Vermeirssen ELM, *et al.* Changes in Plasma gonadotropin II and sex-steroid hormones, and sperm production of striped bass after treatment with controlled-release Gonadotropin-releasing hormone agonist-delivery systems. Biol Reprod, 1997, 57: 669–675
- Constantinos C, Mylonas Yonathan, Zohar L. Curry, *et al.* Hormone profiles of captive striped bass *Morone saxatilis* during spermiation, and long-term enhancement of milt production. J World Aquacult Soc, 1998, 29: 379–392
- Nakamura M, Kobayashi T, Chang X. Gonadal sex differentiation in teleost fish. Exp Zool, 1998, 281: 362–372
- Ohta H, Kagawa H, Tanaka H, *et al.* Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese Eel, *Anguilla japonica*. Fish Physiol Biochem, 1997, 17: 163–169
- Rao CV. An overview of the past, present, and future of non-gonadal LH /hCG actions in reproductive biology and medicine. Semin Reprod Med, 2001, 19: 7–17
- Sorbera LA, Mylonas CC, Zanuy S, *et al.* Sustained administration of GnRHa increases milt volume without altering sperm counts in the sea bass. J Exp Zool, 1996, 276(5): 361–368
- Tong SK, Chung BC. Analysis of zebrafish cyp 19 promoters. J Steroid Biochem, 2003, 86 (3–5): 381–386
- Ziecik AJ, Derecka K, Gawronska B, *et al.* Nongonadal LH/hCG receptors in pig: functional importance and parallels to human. Semin Reprod Med, 2001, 19(1): 19–30
- Zohar Y, Harel M, Hassin S. Gilthead sea bream *Sparus aurata*. Broodstock Management and Egg and Larval Quality. Oxford: Blackwell, 1995, 94–117

(编辑 刘丛力)

## Effects of Sustained-Release Delivery of Sodium Alginate Microsphere-Human Chorionic Gonadotropin (NaAlg-HCG) on Reproductive Hormones in Female Goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus) var

HOU Zhishuai, WEN Haishen, YIN Xianghan

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003)

**Abstract** The sustained-release delivery system of human chorionic gonadotropin (HCG) has been considered as a good method to induce gonad maturation in cultured fish. Sodium alginate microsphere is a new type of sustained-release delivery system of Human Chorionic Gonadotropin (NaAlg-HCG). In this study we implanted the NaAlg-HCG into female goldfish at regular intervals and examined its effects on the gonadal development, the level of major sex hormone in serum, and the expression of genes associated with reproduction hormones. The serum hormone level was measured with Radiate Immuno

Assay (RIA) and the gene expression was examined using RT-PCR. Initially most oocytes of female golden fish were at stage III. From the Day 6 to Day 21 after the implantation, the gonadosomatic index (GSI) of fish implanted with NaAlg-HCG was significantly higher than that of the control group ( $P<0.05$ ). From the Day 6 to Day 30, the levels of both estradiol (E2) and testosterone (T) in the serum of NaAlg-HCG group were significantly higher than those of the control group ( $P<0.05$ ). RT-PCR results showed that from Day 6 to Day 21, the relative expression level of CYP19A of the NaAlg-HCG group was significantly higher than that of the control group ( $P<0.05$ ). From Day 14 to Day 30, the ER $\alpha$  mRNA in the gonad of the NaAlg-HCG group was significantly higher than that of the control group ( $P<0.05$ ). There was no difference in the relative expression level of GH in the gonad between the NaAlg-HCG group and control ( $P>0.05$ ), except for the 2nd day after the implantation of NaAlg-HCG ( $P<0.05$ ). These results suggested that after one-time implantation of NaAlg-HCG, HCG could be released steadily and regularly in 21 days. During this period NaAlg-HCG significantly increased the gonadosomatic index (GSI), the level of sex hormone in the serum, and the relative expression of genes associated with reproduction. The sodium alginate microsphere-based sustained-release delivery system therefore could be a good candidate for hormone implantation.

**Key words** Sustained-release delivery systems; Sodium alginate microsphere-human chorionic gonadotropin; Sex hormone; Gene expression

---

## 《渔业科学进展》编辑部投稿启事

为充分利用网络资源,提高编辑办公和期刊出版效率,《渔业科学进展》编辑部采用新的期刊网络化办公系统(<http://www.yykxjz.cn>)。该系统使投稿、审稿和编辑工作均在同一个网络平台上完成,可大大节省通讯时间,并规范编辑工作流程。同时,网络投稿将以更加友好的界面服务于广大读者,方便作者与编审之间的沟通,为您提供易查、易用、更加方便快捷的服务。

敬请作者访问《渔业科学进展》网站(<http://www.yykxjz.cn>),投稿要求请参看网站中相关内容。

如有疑问,请致电 0532-85833580,或发邮件至: [yykxjz@ysfri.ac.cn](mailto:yykxjz@ysfri.ac.cn)。

《渔业科学进展》编辑部

2014年10月20日