

17 α -甲基睾酮刺激鲮鱼精子发生 机制的初步研究*

方永强

(国家海洋局第三海洋研究所, 厦门)

李正森

(美国夏威夷海洋研究所)

提要 在非繁殖季节, 将 17 α -MT 混入颗粒饵料, 饲喂性腺未成熟的鲮鱼, 对照组喂含酒精饵料, 每日投饵一次, 连续 6 周。研究表明: (1) 实验后第二周, 实验组有少数鱼轻压鱼腹可见少量精液流出, 随后阳性率逐周提高, 第五周达到高峰, 其后持续较恒定水平。(2) 激素处理组释精雄鱼的生殖指数大于不释精雄鱼, 也大于对照组。(3) 鲮鱼睾丸组织学切片看出, 17 α -MT 处理的释精和不释精雄鱼精细管中各级生精细胞均处于生精活动的旺盛时期, 而对照组精细管中充满精原细胞; 另外, 释精和不释精雄鱼的间质细胞的核的体积和数量都大于和多于对照组。因此, 我们认为 17 α MT 可刺激精原细胞增殖、精母细胞成熟分裂和精子形成。

Shehadeh 等^[16]将 17 α 甲基睾酮 (17 α MT) 注射到性腺未成熟的鲮鱼体内可使其释精。近几年, Weber 等^[17]在非繁殖季节, 给鲮鱼投喂含 17 α MT 的颗粒饵料也可刺激精子发生和释精。从而解决了鲮鱼人工繁殖时, 性成熟雄鱼的不足。在此基础上, 本文就 17 α MT 激发生精活动的机制进行初步研究, 为鲮鱼人工繁殖提供基础资料。

一、材料和方法

1. 材料

鲮鱼 (*Mugil cephalus*) 取自夏威夷海洋研究所养殖池。鱼龄 3 年。体重 90—200g 左右。

2. 方法

本实验于 1986 年 8 月 26 日开始, 系在鲮鱼非繁殖季节进行的。

实验前测鱼体长, 称重, 并检查有无精液流出, 后随机分为两组。实验组为 40 尾, 对照组 20 尾(均雌雄混合)。每槽 20 尾, 分别放在 3 个水槽内(长 1.7m, 宽 1.2m, 深 0.6m), 循环海水, 充气。海水盐度为 32—35‰, 平均水温为 27.4℃。

当两组鱼都恢复正常摄食后, 实验组每公斤体重配以 12.5mg 17 α MT^D。给药方式是, 将 17 α MT 先溶在 95% 医用乙醇中, 后均匀喷入颗粒饵料; 对照组饵料则喷入同量

* 本文于 1987 年 11 月全国第四届生殖生物学学术讨论会上宣读。中国科学院动物研究所张致一教授对本文提出过宝贵意见, 深表谢忱。

收稿日期: 1988 年 4 月 13 日。

1) SIGMA 化学公司出品。

酒精。每日上午, 实验组投喂当日剂量的激素饵料, 对照组则喂含酒精饵料(均约体重的 0.5%); 待摄食完毕, 下午补足不经处理的饵料, 避免投饵的不足, 连续 6 周。为观察 17 α MT 的较长期效应, 少数雄鱼达 15 周。

实验开始后第二周, 按 Weber 等^[17]的方法, 逐尾检查实验组和对照组的反应。若第一次轻压鱼腹即可见精液流出为阳性(+++), 第二次为(++), 第三次为(+)。呈阳性反应的雄鱼在背鳍或腹鳍做标记, 以后每周检查一次, 直至实验完毕。结束时, 除少数释精雄鱼继续实验观察外, 其余的鱼全部处死, 仔细取出性腺并称重, 按生殖指数 = $\frac{\text{性腺重}}{\text{鱼体重}} \times 100\%$ 的公式求生殖指数。

组织制备。取性腺前、中、后三部分, 用 Bouin-Hollande 液固定, 石蜡塑料包埋, 连续横切, 厚 3—4 μm , 用苏木精-伊红染色, 并参照 Lofts^[15]的方法, 在显微镜下统计实验组释精和不释精雄鱼, 以及观察对照组各尾雄鱼睾丸中 29—30 个精细管(或称胞囊)各级生精细胞的发育情况, 作为分析和判断 17 α MT 刺激睾丸生精效应的标志。

二、结 果

1. 17 α MT 处理后, 鲮鱼睾丸的变化

实验后第二周, 实验组有少数鱼, 轻压鱼腹可见少量精液流出, 随后阳性率逐周提高, 第五周达到高峰, 以后持续较恒定水平(图 1)。另外, 从表 1 看出, 17 α MT 处理后, 释精雄鱼的生殖指数大于不释精雄鱼, 大于对照组。此结果与前人^[14, 16, 17]报道相一致。

2. 17 α MT 对精子发生的影响

(1) 将实验组与对照组对比, 发现释精和不释精以及对照组雄鱼睾丸精细管中各级生精细胞的发育时期有十分显著的不同(表 2)。从表 2 看出: (1) 实验组的鱼经 17 α MT 处理后, 释精和不释精雄鱼精细管中各级生精细胞均处于生精活动的旺盛时期; 而对照组有些雄鱼睾丸精细管中充满精原细胞, 另一些则精细管中出现初级精母细胞。根据 Grier^[12]对鲮鱼性腺复苏过程的分期标准, 这两种细胞属于精原细胞的增殖期和复苏早期。(2) 以 17 α MT 处理的结果, 释精雄鱼处在复苏后期, 其特点是大多数精细管中有次级精母细胞、分化中的精细胞和大量精子; 而不释精雄鱼处在复苏中期; 延迟至 11 月上旬处理的释精雄鱼处在功能成熟期, 它的特点是, 各个精细管中都充满精子。可见 17 α MT 有激发精原细胞的发育分化和精子形成的作用。

(2) 从睾丸切片的光学显微镜观察结果看出:

(1) 在鲮鱼精细管内可见两种类型精原细胞, 即初级精原细胞和次级精原细胞。前者在精细管内易辨认, 因为它有一个大的核(7.2 μm), 核内含物十分明显, 染色质以块状

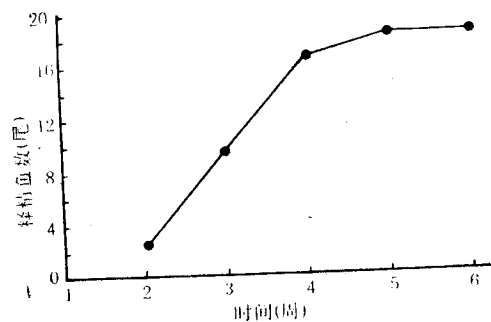


图 1 17 α MT 处理后鲮鱼开始释精时间与数量的关系

Fig. 1 The relation of the mullet releasing milt time to the number after treated by 17 α MT

表 1 在非繁殖季节, 17 α MT 对鳊鱼释精的影响Tab. 1 The effects of 17 α MT on the releasing milt of Grey mullet during the post spawning period (Aug.)

组别	17 α MT. 在食物中 剂量 [mg/(kgW)]	鱼数	最后体重 (g)	生殖指数	释 精 强 度			阳性率 (%)
					+	++	+++	
对照组	0	8	137 \pm 47	0.045 \pm 0.01	0			0
实验组	12.5	14	130 \pm 20	0.22 \pm 0.06	39.5	25	10.5	70
释精雄鱼								
不释精雄鱼		6	113 \pm 44	0.11 \pm 0.01	0	0	0	0

表 2 17 α MT 对精子发生的影响Tab. 2 The effects of 17 α MT on spermatogenesis

组别	处理日期 (年.月.日)	精细管总数	精原细胞数	精原细胞和初 级精母细胞数	初级和次级精 母细胞、精细 胞和精子	精细管和精子	管腔中充 满精子
对照组	1986.9.30	29	23	6	0	0	0
实验组							
不释精雄鱼	1986.9.30	30	6	17	7	0	0
释精雄鱼	1986.9.30	30	0	2	21	7	0
释精雄鱼	1986.11.4	30	0	0	0	0	30

形式排列在核膜的周围,可见染色较深的核仁(N)居中(图版 I:1);次级精原细胞核的体积减小(4.7 μ m),块状染色质分散在核质中,但核仁仍居中,着色也较深,此情况常见于对照组。而以17 α MT处理的释精雄鱼,精原细胞少,分散在底膜上;不释精雄鱼,精原细胞较多;延迟至11月上旬才处死的雄鱼,其精原细胞难于发现。另外,对照组一些雄鱼的精细管内出现初级精母细胞(图版 I:2,箭头所指)。(2)实验组释精和不释精的雄鱼均可见初级精母细胞和次级精母细胞的成熟分裂(图版 I:3,箭头所指)。(3)以17 α MT处理后延迟至11月上旬处死的释精雄鱼,其精细管中充满精子(S)(图版 I:4),提示随时间的延长,17 α MT激发完成睾丸的生精过程。(4)作者还观察到实验组释精雄鱼和不释精雄鱼在精细管之间的间质细胞(或称Leydig细胞)核的体积与细胞数量都大于和多于(图版 I:5)对照组(图版 I:6)。这种不同,表明了17 α MT对垂体促性腺细胞的正反馈作用。Lofts^[14]和Borg^[3]也做过类似的报道。

三、讨论与结论

本文及其他研究者^[16,17]都证实,17 α MT能刺激鳊鱼精子发生,并见于其它种类^[3,10,13,14]。这种雄激素生精效应的机理,Lofts^[14]曾认为是17 α MT刺激精原细胞增殖的缘故;另一些研究者^[5,7]则认为,雄激素(睾酮或17 α MT)只是作用在精子发生的某一些时期,例如精原细胞的增殖,精母细胞的形成及以后的成熟。本文对以17 α MT处理的释精雄鱼、不释精雄鱼和对照组各个睾丸精细管中各级生精细胞的发育时期的分析(表2),为上述各研究者的论点提供了佐证。此外,从延长喂17 α MT的雄鱼,其睾丸中所有精细管

都充满精子来看,我们同意这一论点,即雄激素可控制整个生精过程^[7]。另一方面,对因切除垂体而睾丸退化的鱼类,用高剂量雄激素(丙酸睾酮、17 α MT 等)可使其恢复并维持精子发生^[5,14],这表明雄激素对睾丸生精活动的调节作用是直接的。然而,在正常的鱼类,17 α MT除直接对靶器官的作用外,可否通过对垂体的正反馈途径影响生精活动,本文的研究认为,17 α MT可促使脑垂体分泌促性腺激素参与生精活动。其证据是:(1)以17 α MT处理的释精雄鱼其睾丸间质细胞的核比对照组大,且数量也多,提示间质细胞处于分泌活动。众所周知,此细胞的合成与分泌活动是受脑垂体促性腺细胞所分泌激素的调节的,Borg^[4]也提供这方面的证据。(2)我们观察到以17 α MT处理的雄鳊鱼脑垂体促性腺细胞与对照组的有明显的不同,处理组促性腺细胞空泡数多于对照组,经统计学处理差异显著¹⁾。研究已经证实,这种空泡是促性腺细胞分泌活动旺盛的一种标志^[1],是粗面内质网扩张所致^[2,3]。Crim^[8,9]用放免测定法直接证实,给性腺未成熟虹鳟鱼(rainbow trout)注射睾酮后,血液中促性腺激素的水平上升。17 α MT促进脑垂体促性腺细胞的分泌活动还可见于其它种类^[3,4]。最近 Goos^[10]报道了睾酮有刺激未成熟虹鳟鱼促性腺激素释放素(GnRH)的合成与释放从而使其性早熟的作用。上述说明,雄激素在丘脑下部—脑垂体—性腺轴的相互关系中起着重要的作用^[11]。

当然,17 α MT对鱼类精子发生的影响,不仅有上述的激发作用,也有明显的抑制作用^[5,6],可导致睾丸退化。造成截然不同效果的原因,取决于实验动物的种类、处理的季节和处理时性腺发育的时期。

综上所述,给雄鳊投喂含17 α MT的食物,可刺激精原细胞的增殖、精母细胞的成熟分裂和精子形成;同时,还发现睾丸间质细胞核的体积和数量都比对照组大和多;鳊鱼睾丸所发生的这些显著的变化,有助于阐明17 α MT的作用机制。

参 考 文 献

- [1] 方永强、汪敏等,1981。丘脑下部促黄体素释放激素类似物(LRH-A)的作用机制 I. 脑垂体组织生理学的研究。动物学报 27(3): 203—207。
- [2] 方永强、汪敏,1983。丘脑下部促黄体素释放激素类似物(LRH-A)的作用机制 III. 对罗非鱼脑垂体促性腺激素分泌细胞的超微结构影响。动物学报 29(2): 124—128。
- [3] Borg, B. et al., 1986. Stimulatory effects of methyltestosterone on pituitary gonadotropic cells and testes Leydig cells of the three-spined stickleback, *Gasterosteus* L. in winter. *Gen. Comp. Endocrinol.* 62: 54—61.
- [4] Borg, B. et al., 1985. Stimulation of gonadotropic cells by methyltestosterone in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. *Teleostic Verh. Anat. Ges. Jena.* 79: 525—526.
- [5] Billard, R. et al, 1982. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Can. J. Aquat. Sci.* 39: 65—79.
- [6] Billard, R. et al, 1982. Inhibition of spermatogenesis and vitellogenesis in rainbow trout by hormonal additives in the diet. *Prog. Fish-Cult.* 44: 15—18.
- [7] Callard, L. P., et al, 1978. Testicular regulation in nonmammalian vertebrates. *Biol. Reprod.* 18: 16—43.
- [8] Crim, L. W. and D. M. Evans, 1979. Stimulation of pituitary gonadotropin by testosterone in juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 37: 192—196.
- [9] Crim, L. W., et al, 1981. Onset of gonadotropic hormone accumulation in the immature trout pituitary gland in response to estrogen or aromatizable androgen steroid hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.* 44: 374—381.
- [10] Goos, H. J. Th, et al, 1986. Gonadotropin hormone-releasing (GnRH) bioactivity in the brain of the immature rainbow trout, *Salmo gairdneri*: The effect of testosterone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 64: 80—84.
- [11] Gielen, J. Th and H. J. Th. Goos, 1983. The brain-pituitary gonadal axis in the rainbow trout, *Salmo*

1) 方永强,李正森,1988。Aquaculture (待刊)。

- gairdneri* II Direct effect of gonadal steroid on the gonadotropic cells. *Cell. Tissue Res.* **233**: 377—388.
- [12] Grier, H. J., 1981. Cellular organization of testis of spermatogenesis in fishes. *Amer Zool* **21**: 345—357.
- [13] Lee, C. S., et al, 1986. Effect of orally-administered 17α methyltestosterone on spermatogenesis in immature milkfish, *Chanos chanos* Forsskal. *J. Fish Biol.* **29**: 567—572.
- [14] Lofts, B., et al, 1966. Effects of methyltestosterone on the testes of a hypophysectomized cyprinodont fish, *Fundulus heteroclitus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **6**: 74—88.
- [15] Lofts, B., 1964. Seasonal change in the function activity of the green frog *Rana esculenta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **4**: 550—562.
- [16] Shehadeh, Z. H., et al, 1973. The effect of exogenous hormone treatment on spermiation and vitellogenesis in the grey mullet, *Mugil cephalus* L. *J. Fish Biol.* **5**: 479—487.
- [17] Weber, G. M. and C. S. Lee., 1985. Effects of 17α methyltestosterone on spermatogenesis and spermiation in the grey mullet, *Mugil cephalus* L. *J. Fish. Biol.* **26**: 77—84.

THE PRELIMINARY STUDY ON THE MECHANISM OF THE ACTION OF 17α METHYLTESTOSTERONE STIMULA- TORY SPERMATOGENESIS IN THE GREY MULLET (*MUGIL CEPHALUS* L.)

Fang Yongqiang

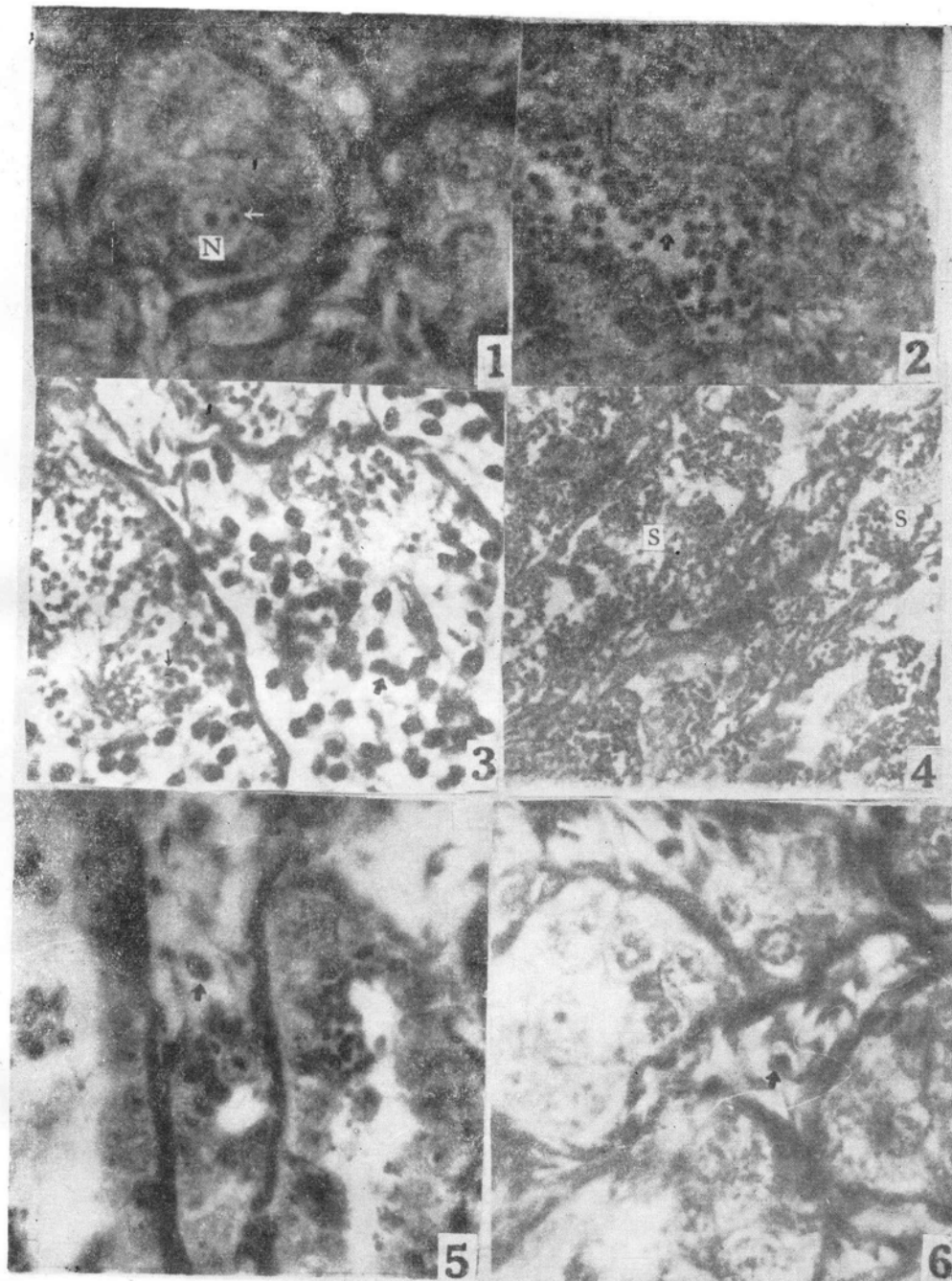
(Third Institute of Oceanography, SOA, Xiamen)

Lee Cheng-sheng

(Oceanic Institute of Hawaii, Waimanalo)

ABSTRACT

Diets containing 17α methyltestosterone (17α MT) were fed to mullet during the early recrudescence of gonad in its reproductive cycle. The daily dosage of 17α MT per kg of body weight was 12.5 mg in experiment. Experimental fishes were fed with diet containing 17α MT every day for 6 weeks. The control group did not receive 17α MT. Results are as follows. (1) At the second week of the experiment, light pressure was applied to the abdomen and some amount of milt was observed being released in experimental group. Later the number of fishes releasing milt increased, reaching the peak at fifth week. (2) The gonadosomatic indices of the male fish releasing milt in the hormonally treated group were greater than the male fish releasing no milt and the control group. (3) According to the observation of the testicular section, the 17α MT might initiate the spermatogonia proliferation, spermatocyte meiosis and spermiogenesis, and all the seminiferous tubule of the male fishes releasing or not releasing milt of the treated group were active in spermatogenic activity, but all the seminiferous tubule of the control group were full of spermatogonia. On the other hand, the leydig cell nuclei were larger in the 17α MT treatment group than those of controls. This finding suggests the positive feedback of 17α MT on the pituitary-gonadal axis of the male mullet. Finally, the mechanism of 17α MT stimulatory spermatogenic activity was also discussed in the paper.



1. 对照组鳊鱼初级精原细胞,核(N)大,核仁居中,染色质贴在核膜上(箭头所示), $\times 3840$; 2. 对照组鳊鱼精细管中出现初级精母细胞(箭头所示), $\times 1024$; 3. 17 α 甲基睾酮处理组释精雄鱼可见初级精母细胞(粗箭头)和次级精母细胞(细箭头)的成熟分裂, $\times 2560$; 4. 17 α 甲基睾酮较长期处理的释精雄鱼,精细管中充满精子(S), $\times 640$; 5. 17 α 甲基睾酮处理组释精雄鱼间质细胞核(箭头所示), $\times 3000$; 6. 对照组鳊鱼精细管之间的间质细胞核(箭头所示),较小, $\times 3000$ 。