

6种石斑鱼成鱼的性腺发育、脑垂体结构以及垂体中FSH β 和LH β 细胞的免疫识别

徐文刚, 刘立明, 王九龙, 邹华锋, 于文松, 征矢野清, 唐永政

Gonadal development, pituitary structures and immunohistochemical identification of FSH and LH cells in the pituitary in six species of the adult groupers

XU Wengang, LIU Liming, WANG Jiulong, ZOU Huafeng, YU Wensong, SOYANO Kiyoshi, TANG Yongzheng

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20201203259>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

黑边石斑鱼卵巢周年发育及血清中性激素含量的变化

Annual ovarian development and changes in the concentration of serum sex hormones in blacktip grouper *Epinephelus fasciatus*
上海海洋大学学报. 2020, 35(5): 657 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-274>

石斑鱼杂交种“云龙斑”与亲本的表型数量性状判别分析

Analysis of phenotypic quantitative traits of kelp grouper, giant grouper and hybrid progeny
上海海洋大学学报. 2017, 26(6): 808 <https://doi.org/10.12024/jsou.20170402018>

酵母培养物对珍珠龙胆石斑鱼生长性能、肠道形态、免疫功能和抗病力的影响

Effects of Dietary Yeast Culture Supplementation on Growth, Intestinal Morphology, Immunity, and Disease Resistance in *Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂
上海海洋大学学报. 2021, 41(3): 1 <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-9159.2021.03.001>

海洋性动物水解蛋白对珍珠龙胆石斑鱼生长、饲料利用及体组成的影响

Effects of marine animal protein hydrolysates on growth, feed utilization and body composition of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂)
上海海洋大学学报. 2021, 30(4): 624 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200503046>

不同蛋白水平下添加抗菌肽对赤点石斑鱼影响的研究

Effect of antibacterial peptides supplementation in different protein level diets on grouper (*Epinephelus akaara*)
上海海洋大学学报. 2017, 26(3): 383 <https://doi.org/10.12024/jsou.20160801839>

文章编号: 1674-5566(2022)01-0151-10

DOI:10.12024/jsou.20201203259

6 种石斑鱼成鱼的性腺发育、脑垂体结构以及垂体中 FSH β 和 LH β 细胞的免疫识别

徐文刚¹, 刘立明¹, 王九龙¹, 邹华锋², 于文松³, 征矢野清⁴, 唐永政¹

(1. 烟台大学 海洋学院, 山东 烟台 264005; 2. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 3. 烟台市海洋经济研究院, 山东 烟台 264003; 4. 长崎大学环中国东海环境资源研究所, 日本 长崎 851-2213)

摘要: 以日本海域捕获的宝石石斑鱼 (*Epinephelus areolatus*)、黑边石斑鱼 (*E. fasciatus*)、赤点石斑鱼 (*E. akaara*)、尾纹九棘鲈 (*Cephalopholis urodeta*)、蜂巢石斑鱼 (*E. merra*) 和纹波石斑鱼 (*E. ongus*) 成鱼为对象, 比较其性腺发育和脑垂体结构以及垂体中 FSH β 和 LH β 免疫信号的分布。结果表明: 宝石石斑鱼、黑边石斑鱼、赤点石斑鱼和尾纹九棘鲈性腺发育为未成熟阶段, 蜂巢石斑鱼和纹波石斑鱼性腺发育为成熟阶段。6 种石斑鱼的脑垂体位于间脑腹面, 由神经垂体 (NH) 和腺垂体 (AH) 组成。腺垂体从左至右进一步细分为前外侧部 (RPD)、中外侧部 (PPD) 和中间部 (PI)。在宝石石斑鱼、赤点石斑鱼和纹波石斑鱼中 NH 结构被 PPD 隔开分为上下两部分, 而在黑边石斑鱼、尾纹九棘鲈和蜂巢石斑鱼中 NH 为一个整体。6 种石斑鱼脑垂体中 FSH β 和 LH β 细胞的免疫信号主要分布在 PPD 和 PI 区域, 且 FSH β 信号强度均较 LH β 强, 推断在石斑鱼性腺发育成熟前后, FSH β 较 LH β 重要。为石斑鱼的资源保护及人工繁殖方面提供基础生物学资料和理论依据。

关键词: 石斑鱼成鱼; 性腺发育; 脑垂体结构; FSH β ; LH β ; 免疫组织化学

中图分类号: S 965.3 **文献标志码:** A

石斑鱼 (*Epinephelus* sp.) 隶属于鲈形目 (Perciformes) 鲈科 (Serranidae) 石斑鱼亚科 (Epinephelinae) 石斑鱼属 (*Epinephelus*), 广泛分布于中国、日本、韩国以及其他亚洲国家, 因其高品质的鱼肉和较高的商业价值而被认为最重要的海洋经济鱼类之一^[1]。作为一种受欢迎的海水鱼类, 其产量在中国逐年增加并在 2019 年达到 18.31 万 t^[2]。石斑鱼属于雌雄同体先雌后雄型海水鱼类, 在我国东海和南海等沿海渔业中均有分布且占有重要地位, 因此具有较高的研究价值。目前, 国内外已经在赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) 性成熟^[3] 和性逆转^[4] 以及黑边石斑鱼 (*E. fasciatus*)^[5] 和褐石斑鱼 (*E. bruneus*)^[6] 苗种生产等技术方面取得了较大的进步。在石斑鱼苗种繁殖生产中, 检测脑垂体促性腺激素

(gonadotropins, GtHs) β 亚基单元的促卵泡激素 (follicle stimulating hormone, FSH β) 和黄体生成素 (luteinizing hormone, LH β) 含量被认为是探索性腺发育与 GtHs 关联的有效方法^[7-12]。

迄今为止, 国内外大多数研究报道中有关鱼类脑垂体分泌的 FSH β 和 LH β 激素的检测方法主要有 RNA 水平的检测和蛋白水平的检测。其中: RNA 水平的检测主要有 RT-PCR、qPCR 和原位杂交 (in situ hybridization, ISH) 技术; 蛋白水平的检测主要有蛋白免疫印迹 (Western blot) 和免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 技术。目前, 运用 qPCR 检测石斑鱼脑垂体中 FSH β 和 LH β 的技术得到快速发展。例如, 在点带石斑鱼 (*E. malabaricus*)^[7]、蜂巢石斑鱼 (*E. merra*)^[8]、斜带石斑鱼 (*E. coioides*)^[9]、褐石斑鱼^[10]、乌鳍

收稿日期: 2020-12-28 修回日期: 2021-03-14

基金项目: 日本学术振兴会 (JSPS) 研究项目 (26660173); 山东省农业重大应用技术创新项目 (SD2019YY003); 烟台大学博士科研启动基金 (HX20B29)

作者简介: 徐文刚 (1985—), 男, 博士, 研究方向为海水鱼类繁殖和内分泌。E-mail: xugang@ytu.edu.cn

通信作者: 唐永政, E-mail: 13906380063@163.com

石斑鱼 (*E. marginatus*)^[11] 和赤点石斑鱼^[12] 中, 均有 FSH β 和 LH β 基因含量被检测的报道。然而, 运用 IHC 技术对 FSH β 和 LH β 蛋白表达定位的检测仅在点带石斑鱼^[7] 和蜂巢石斑鱼^[8] 中有少量报道。此外, 在一些刚孵化的幼鱼比如点带石斑鱼^[7]、蜂巢石斑鱼^[8] 和赤点石斑鱼^[12] 中, 由于脑垂体器官太小, FSH β 和 LH β 的基因含量太低而无法用 qPCR 技术检测到, 所以运用 IHC 技术对石斑鱼脑垂体中 FSH β 和 LH β 蛋白表达进行识别和定位, 这对于石斑鱼繁殖信息的补充和完善具有重要意义。

本实验以在日本长崎市沿岸海域和冲绳濠底岛海域广泛分布的 6 种石斑鱼成鱼为研究对象, 分别是宝石石斑鱼 (*E. areolatus*)、黑边石斑鱼、赤点石斑鱼、尾纹九棘鲈 (*Cephalopholis urodeta*)、蜂巢石斑鱼和纹波石斑鱼 (*E. ongus*), 比较其生长指数、性腺发育情况和脑垂体结构的差异, 同时运用 IHC 技术检测各石斑鱼脑垂体中 FSH β 和 LH β 细胞的分布和定位。旨在探索石斑鱼成鱼性腺发育过程中脑垂体中 FSH β 和 LH β 激素的角色, 以提供更多的内分泌信息为其人工繁殖和苗种生产及资源保护提供基础生物学资料 and 理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2018 年 6—9 月, 采用渔船捕捞作业和垂钓法相结合的方式, 在日本长崎市沿岸海域随机捕获黑边石斑鱼、赤点石斑鱼和纹波石斑鱼, 挑选雌性成鱼用于实验, 数量分别为 6、4 和 6 尾。2019 年 6—9 月, 采用渔船捕捞作业和垂钓法相结合的方式, 在日本冲绳县濠底岛附近海域随机捕获宝石石斑鱼、尾纹九棘鲈和蜂巢石斑鱼, 挑选雌性成鱼用于实验, 数量分别为 6、7 和 5 尾。

1.2 方法

1.2.1 性腺和脑垂体样品的采集

所捕获的石斑鱼成鱼用 2-苯氧乙醇麻醉后测量其体长 (total length, TL) 和体质量 (body weight, BW), 然后解剖采样。取出性腺, 测定质量 (gonadal weight, GW) 后将其固定在波恩试剂中, 参照文献 [13] 中的方法计算性腺指数 (Gonadosomatic index, GSI)。之后打开头盖骨, 去除外骨骼后将脑和脑垂体整体固定在波恩试

剂中; 如无法单独取下脑和脑垂体整体, 则将脑和脑垂体连同部分头盖骨一同固定在波恩试剂中。固定在波恩试剂中的样品, 24 ~ 48 h 后转移至 70% 的乙醇中保存用于组织学分析。

1.2.2 性腺切片的制备和组织学观察

对各石斑鱼的性腺进行常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋和连续切片, 厚度为 5 ~ 7 μm 。采用苏木精-伊红法 (hematoxylin-eosin, H. E.) 对切片进行染色和中性树胶封片, 在 Olympus FX380 型光学显微镜下观察并拍照, 以切片图中生殖细胞最发达阶段为性腺的发育阶段。参考文献 [14-16] 的标准对卵母细胞的发育依次分为核仁外周期 (peri-nucleolus stage, Pn)、卵黄囊泡期 (yolk vesicle stage, Yv)、次级卵黄球期 (secondary yolk stage, Sy) 和三级卵黄球期 (tertiary yolk stage, Ty)。其中, Pn 和 Yv 阶段为性腺发育未成熟期, Sy 和 Ty 为成熟期。

1.2.3 脑垂体切片的制备

宝石石斑鱼、黑边石斑鱼、赤点石斑鱼、尾纹九棘鲈、蜂巢石斑鱼和纹波石斑鱼固定在波恩试剂中脑垂体样品数量分别为 6、6、4、7、5 和 6 尾。取固定在波恩试剂中的样本, 对脑垂体头盖骨用 EDTA 脱钙液进行脱钙, 然后对脱钙的样本进行常规梯度乙醇脱水 (乙醇浓度依次为 90%、95%、100%)、乙醇丁醇混合系列 (乙醇与丁醇体积比依次为 4:1、3:2、2:3、1:4, 最终 100% 丁醇)、石蜡包埋和连续切片, 厚度为 5 ~ 8 μm 。切片用于免疫组织化学 (IHC) 实验。

1.2.4 免疫组织化学

样品固定在波恩试剂后, 其脑垂体中的 FSH β 和 LH β 蛋白抗原会被封闭, 因此必须进行抗原暴露实验。将上述切片用梯度乙醇脱水后浸泡在 10 mmol/L 柠檬酸溶液中, 用微波炉加热至 90 $^{\circ}\text{C}$ 并恒温保持 15 min。随后将切片置于室温下冷却 1 h 并用蒸馏水洗净。

IHC 实验采用抗生物素蛋白-生物素过氧化物酶法, 参照文献 [7-8] 的方法并加以改进。切片浸泡在 0.3% H_2O_2 的甲醇中 1 h, 用 PBS 缓冲液冲洗干净后在 10% 山羊血清中封闭 15 min, 分别滴加由 SHIMIZU 等^[17] 赠送的兔抗底鳃 (*Fundulus heteroclitus*) FSH β (体积比为 1:1 000) 和 LH β (体积比为 1:5 000) 第一抗体^[7-8] 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 晚, 然后用 PBS 缓冲液冲洗 15 min。用

SAB-PO(R) 试剂盒 (Nichirei Biosciences Inc., Japan) 中的山羊抗兔 IgG 第二抗体溶液孵育 1 h, 在 PBS 中漂洗 15 min 后用链霉亲和素-HRP (horseradish peroxidase) 溶液孵育 30 min。随后再次在 PBS 缓冲液中冲洗 10 min, 最后用试剂盒中的 DAB 辣根过氧化物酶显色液 (DAB horseradish peroxidase) 观察免疫反应的信号。切片用苏木精轻轻复染后显微镜观察并摄影, 根据 FSH β 和 LH β 细胞免疫染色的深浅程度判断其信号的强弱。

1.3 数据处理

试验数据以平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示。采用 SPSS 22.0 对数据进行比较分析, 利用 ANOVA 检验及 Tukey's 法进行差异性比较分析, 显著性水平设为 0.05。

2 结果与分析

2.1 6种石斑鱼采样日期、数量、生长指数及其性腺的发育

宝石石斑鱼、黑边石斑鱼和赤点石斑鱼数量分别为 6、6 和 4 尾 (表 1), 其体长均在 30 cm 以上, 体质量在 500 g 以上。宝石石斑鱼采样日期为 2019 年 9 月, 卵巢发育为 Pn 阶段 (图版 I-1); 黑边石斑鱼采样日期为 2018 年 9 月, 卵巢发育为 Pn 阶段 (图版 I-2); 赤点石斑鱼采样日期亦为 2018 年 9 月, 卵巢发育为 Pn 阶段 (图版 I-3)。

尾纹九棘鲈、蜂巢石斑鱼和纹波石斑鱼数量分别为 7、5 和 6 尾, 体长 14 ~ 19 cm, 体质量 50 ~ 130 g。尾纹九棘鲈采样日期为 2019 年 8 月, 卵巢发育为 Yv 阶段 (图版 I-4); 蜂巢石斑鱼采样日期为 2019 年 6 月, 卵巢发育为 Sy 阶段 (图版 I-5); 纹波石斑鱼采样日期亦为 2018 年 6 月, 卵巢发育为 Ty 阶段 (图版 I-6)。宝石石斑鱼、黑边石斑鱼和赤点石斑鱼的体质量显著高于尾纹九棘鲈和蜂巢石斑鱼 ($P < 0.05$), 性腺质量显著高于纹波石斑鱼 ($P < 0.05$)。宝石石斑鱼、黑边石斑鱼、赤点石斑鱼和尾纹九棘鲈性腺发育处于未成熟阶段; 蜂巢石斑鱼和纹波石斑鱼性腺发育处于成熟阶段。

2.2 6种石斑鱼脑垂体的结构及垂体中 FSH β 和 LH β 细胞的分布模式图

石斑鱼的脑垂体位于间脑腹面, 由 1 个短柄与下丘脑相连, 悬垂而下, 嵌藏在脑颅副蝶骨背面的小凹窝内^[18]。6 种石斑鱼的脑垂体呈漏斗状结构, 由神经垂体 (neurohypophysis, NH) 和腺垂体 (adenohypophysis, AH) 两部分构成, 见图版 II。根据不同的着色区域和边界, 腺垂体进一步分为 3 小部分, 从左至右依次为前外侧部 (rostral pars distalis, RPD)、中外侧部 (proximal pars distalis, PPD) 和中间部 (pars intermedia, PI, 见图版 II-1, 2, 3, 10, 11 和 12)。

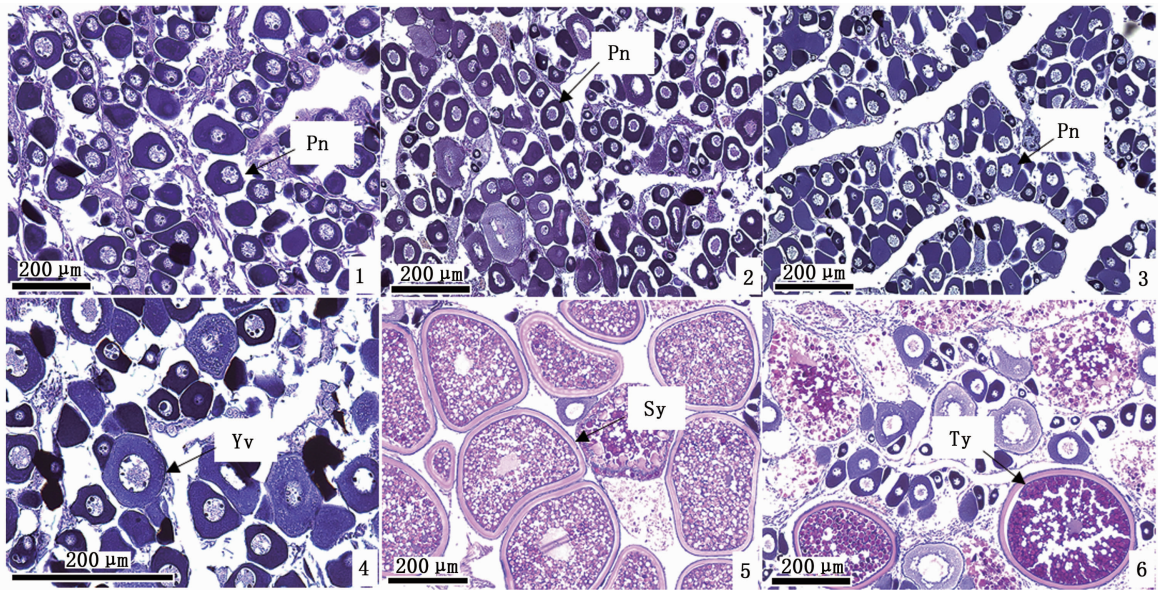
表 1 6种石斑鱼的采样时间、数量、生长指数以及性腺发育阶段

Tab.1 Changes of sampling time, number, growth index, and gonadal development in six species of groupers

物种 Species	采样日期 Sampling date	数量 Number/ 尾	体长 Total length/cm	体质量 Body mass/g	性腺质量 Gonad mass/g	性腺指数 GSL/%	卵巢阶段 Ovary stage
宝石石斑鱼 <i>Epinephelus areolatus</i>	2019.9	6	38.17 \pm 2.22	775.83 \pm 156.58 ^a	6.77 \pm 2.65 ^a	0.76 \pm 0.17	Pn
黑边石斑鱼 <i>E. fasciatus</i>	2018.9	6	30.42 \pm 1.35	529.57 \pm 76.85 ^a	4.84 \pm 1.67 ^a	0.65 \pm 0.04	Pn
赤点石斑鱼 <i>E. akaara</i>	2018.9	4	35.94 \pm 2.05	735.12 \pm 130.58 ^a	3.18 \pm 1.01 ^a	0.48 \pm 0.03	Pn
尾纹九棘鲈 <i>Cephalopholis urodeta</i>	2019.8	7	14.12 \pm 0.38	56.12 \pm 1.48 ^b	1.10 \pm 0.18 ^{ab}	2.08 \pm 0.03	Yv
蜂巢石斑鱼 <i>E. merra</i>	2019.6	5	19.01 \pm 0.67	52.68 \pm 2.49 ^b	1.05 \pm 0.34 ^{ab}	1.89 \pm 0.26	Sy
纹波石斑鱼 <i>E. ongus</i>	2018.6	6	19.52 \pm 1.42	128.04 \pm 36.55 ^{ab}	0.16 \pm 0.05 ^b	0.15 \pm 0.03	Ty

注: 标有不同小写字母者表示同列样本间有显著性差异 ($P < 0.05$), 标有相同小写字母或者无字母者表示样本间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

Notes: Means of samplings with different lower-case letters within the same column are very significantly different at the 0.05 probability level, and the means with the same lower-case letters or without letters have not significant differences.



1. 宝石石斑鱼 *Epinephelus areolatus*; 2. 黑边石斑鱼 *E. fasciatus*; 3. 赤点石斑鱼 *E. akaara*; 4. 尾纹九棘鲈 *Cephalopholis urodeta*; 5. 蜂巢石斑鱼 *E. merra*; 6. 纹波石斑鱼 *E. ongus*; Pn. 核仁外周期; Yv. 卵黄囊泡期; Sy. 次级卵黄球期; Ty. 三级卵黄球期。
1. Areolate grouper *Epinephelus areolatus*; 2. Blacktip grouper *E. fasciatus*; 3. Red spotted grouper *E. akaara*; 4. Flagtail grouper *Cephalopholis urodeta*; 5. Honeycomb grouper *E. merra*; 6. White-streaked grouper *E. ongus*; Pn. Perinucleolus; Yv. Yolk vesicle; Sy. Secondary yolk; Ty. Tertiary yolk.

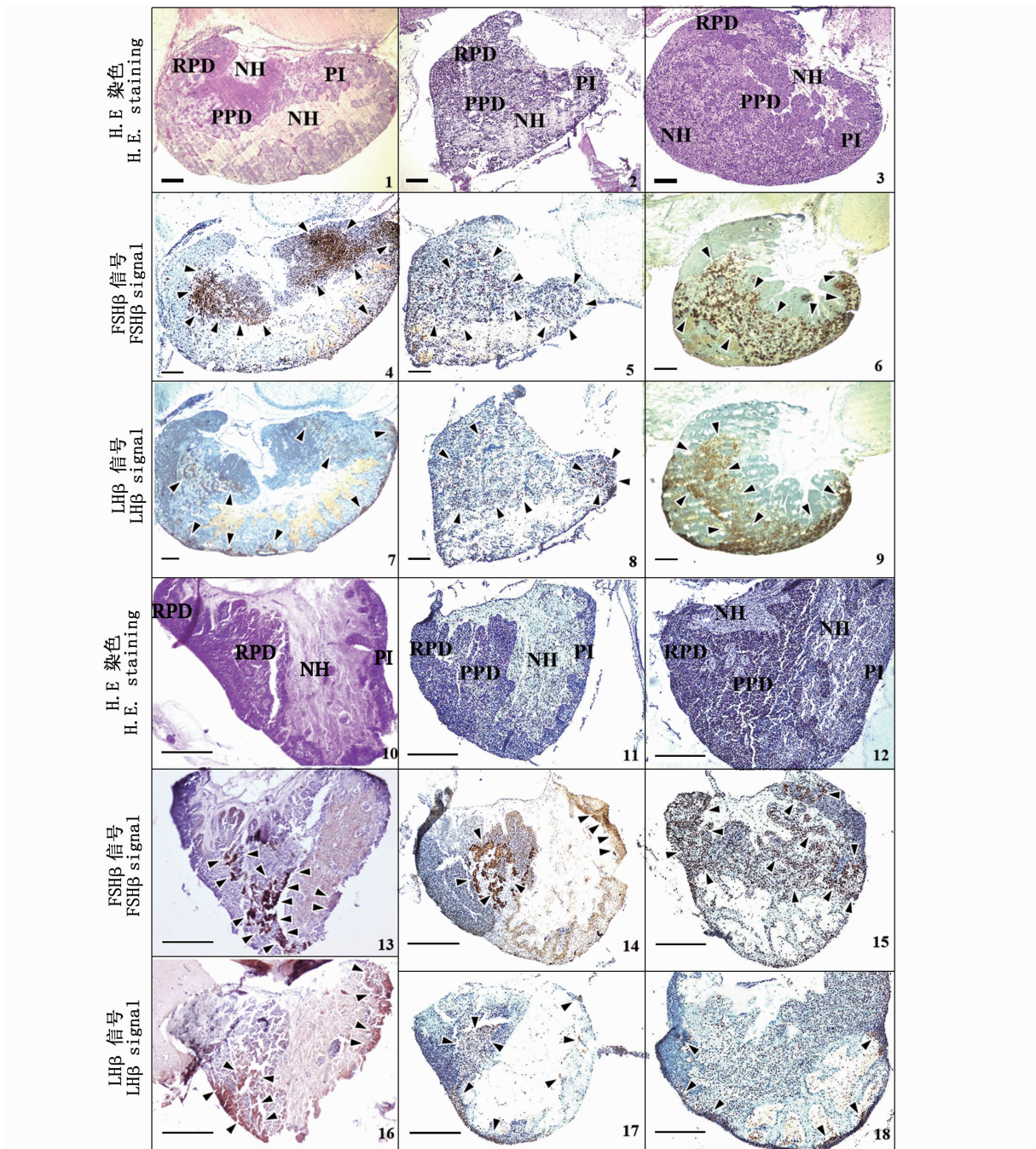
图版 I 6 种石斑鱼卵巢发育阶段的切片图

Plate I Histological sections of ovary development stages in six species of groupers

参照文献[7-8]报道 IHC 实验中对 FSH β 和 LH β 阳性信号检测的判断,6 种石斑鱼脑垂体中 FSH β 和 LH β 细胞的分布如图版 II 中箭头所示。在宝石石斑鱼中,FSH β 免疫信号主要分布在 PPD 和 PI 区域,LH β 信号少量分布在 PPD 和 PI 区域(图版 II-4 和 7)。在黑边石斑鱼中,FSH β 和 LH β 信号少量分布在 PPD 和 PI 区域(图版 II-5 和 8)。在赤点石斑鱼中,FSH β 和 LH β 信号主要分布在 PPD 和 PI 区域(图版 II-6 和 9)。在尾纹九棘鲈中,FSH β 信号主要分布在 PPD 区域,少量分布在 PI 区域,LH β 信号少量分布在 PPD 和 PI 区域(图版 II-13 和 16)。在蜂巢石斑鱼中,

FSH β 信号主要分布在 PPD 区域,少量分布在 PI 区域,LH β 信号少量分布在 PPD 和 PI 区域(图版 II-14 和 17)。在纹波石斑鱼中,FSH β 信号主要分布在 PPD 和 PI 区域,LH β 信号少量分布在 PPD 和 PI 区域(图版 II-15 和 18)。关于免疫信号强度的比较,6 种石斑鱼脑垂体中的 FSH β 信号均较 LH β 强。

宝石石斑鱼、赤点石斑鱼和纹波石斑鱼脑垂体中的 NH 结构被 PPD 隔开分为上下两部分(图版 II-1,3 和 12,图 1a)。黑边石斑鱼、尾纹九棘鲈和蜂巢石斑鱼脑垂体中的 NH 结构为一个整体(图版 II-2,10 和 11,图 1b)。

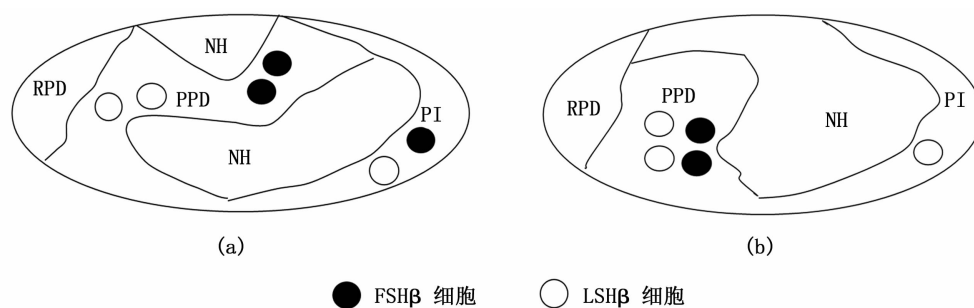


1,4 和 7. 宝石石斑鱼 *Epinephelus areolatus*; 2,5 和 8. 黑边石斑鱼 *E. fasciatus*; 3,6 和 9. 赤点石斑鱼 *E. akaara*; 10,13 和 16. 尾纹九棘鲈 *Cephalopholis urodeta*; 11,14 和 17. 蜂巢石斑鱼 *E. merra*; 12,15 和 18. 纹波石斑鱼 *E. ongus*; NH. 神经垂体; RPD. 前外侧部; PPD. 中外侧部; PI. 中间部。箭头表示 FSH β 和 LH β 阳性信号。比例尺 = 200 μ m。

1, 4 and 7. Areolate grouper *Epinephelus areolatus*; 2,5 and 8. Blacktip grouper *E. fasciatus*; 3,6 and 9. Red spotted grouper *E. akaara*; 10, 13 and 16. Flagtail grouper *Cephalopholis urodeta*; 11,14 and 17. Honeycomb grouper *E. merra*; 12,15 and 18. White-streaked grouper *E. ongus*. NH. Neurohypophysis; RPD. Rostral pars distalis; PPD. Proximal pars distalis; PI. Pars intermedia. Arrows indicated positive signals. Scale bar = 200 μ m.

图版 II 6种石斑鱼脑垂体结构及垂体中 FSH β 和 LH β 细胞的切片图

Plate II Histological sections of the pituitary structures and immunoreactive signals of FSH β and LH β producing cells in six species of adult groupers



宝石石斑鱼 *Epinephelus areolatus*、赤点石斑鱼 *E. akaara* 和纹波石斑鱼 *E. ongus* 脑垂体结构属于模式图 a 类型;黑边石斑鱼 *E. fasciatus*、尾纹九棘鲈 *Cephalopholis urodeta* 和蜂巢石斑鱼 *E. merra* 脑垂体结构属于模式图 b 类型。

The pattern diagram of pituitary structures in areolate grouper *Epinephelus areolatus*, red spotted grouper *E. akaara* and white-streaked grouper *E. ongus* belongs to type a, and the blacktip grouper *E. fasciatus*, flagtail grouper *Cephalopholis urodeta* and honeycomb grouper *E. merra* belong to type b.

图 1 6 种石斑鱼脑垂体结构及垂体中 FSH β 和 LH β 细胞分布模式图

Fig. 1 Pattern diagram of pituitary structures and immunoreactive signals of FSH β and LH β producing cells in six species of adult groupers

3 讨论

3.1 6 种石斑鱼脑垂体中 FSH β 和 LH β 细胞的抗原特异性

目前,运用 IHC 技术识别鱼类脑垂体 FSH β 和 LH β 细胞的研究中,关键因素在于第一抗体能否与抗原相结合,因为抗体与抗原之间存在物种特异性反应。以往的研究结果表明,由日本学者 SHIMIZU 等^[19]开发的兔抗底鳃 FSH β 和 LH β 抗体不仅被运用在检测底鳃垂体中的 FSH β 和 LH β 细胞,也被运用于真鲷 (*Pagrus major*)^[20]、小口黑鲈 (*Micropterus dolomieu*)^[21] 和慈鲷 (*Cichlasoma dimerus*)^[22] 上,表明兔抗底鳃 FSH β 和 LH β 抗体能够很好地与多种鱼类的抗原相结合,尤其此抗体也适用于石斑鱼比如点带石斑鱼^[7] 和蜂巢石斑鱼^[8] 中。因此本研究将其用于包括蜂巢石斑鱼在内的 6 种石斑鱼中,且检测到阳性信号,表明兔抗底鳃 FSH β 或 LH β 抗体适用于本实验中的 6 种石斑鱼。

3.2 6 种石斑鱼脑垂体结构的差异以及垂体中 FSH β 和 LH β 细胞的分布

本实验中,6 种石斑鱼的脑垂体结构类似,分为 NH、RPD、PPD 和 PI 部分,虽与以往的研究结果^[23] 大致相同,但也有细微差异。在宝石石斑鱼、赤点石斑鱼和纹波石斑鱼中,NH 结构被 PPD 隔开分为上下两部分;而在黑边石斑鱼、尾纹九棘鲈和蜂巢石斑鱼中,NH 为一个整体。已有研

究表明,在点带石斑鱼^[7]、蜂巢石斑鱼^[8]、银汉鱼 (*Odontesthes bonariensis*)^[24]、底鳃^[25]、斑锯脂鲤 (*Serrasalmus maculatus*)^[26]、蓝鳍金枪鱼 (*Thunnus thynnus*)^[27] 和金头鲷 (*Sparus aurata*)^[28] 的脑垂体结构图中,NH 为一个整体,只有在尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[29] 中,NH 被 PPD 隔开分为上下两部分,表明鱼类脑垂体结构中的 NH 部分可能由于切片实验时所取部位的不同而有所差异。虽然本实验中的宝石石斑鱼、赤点石斑鱼和纹波石斑鱼的 NH 结构被 PPD 隔开分为上下两部分,但在大多数鱼类的结构模式图中,NH 结构作为一个整体存在。

6 种石斑鱼中,FSH β 细胞均分布在 PPD 和 PI 区域。已有研究^[8] 表明,在蜂巢石斑鱼中,FSH β 细胞主要分布在 PPD 和 PI 区域,与本研究结果类似。然而在点带石斑鱼中,FSH β 仅分布在 PPD 区域^[7],表明 FSH β 的分布因石斑鱼种类的不同而有所差异。在其他海水鱼类如金头鲷^[28] 中,FSH β 细胞分布在 PPD 和 PI 区域;但在蓝鳍金枪鱼^[27] 中,FSH β 细胞仅分布在 PPD 区域,表明在多数海水鱼类中,FSH β 的分布存在两种模式,分布于 PPD 和 PI 区域(图 1a)或仅分布于 PPD 区域(图 1b)。6 种石斑鱼 FSH β 细胞的分布见图 1a。此外,本实验的 6 种石斑鱼中,LH β 细胞均分布在 PPD 和 PI 区域。在点带石斑鱼^[7]、蜂巢石斑鱼^[8]、蓝鳍金枪鱼^[27]、金头鲷^[28] 和地中海鲷鱼^[30] 中,LH β 细胞均分布在 PPD 和

PI 区域,与本研究结果类似,表明在多数海水鱼类中,LH β 分布在 PPD 和 PI 区域。

3.3 6种石斑鱼的生长和性腺发育成熟及其与 FSH β 和 LH β 之间的联系

已有研究表明:宝石石斑鱼^[31-32]在1—5月,体长超过28 cm时出现成熟雌性个体;黑边石斑鱼^[33]在7—8月,体长超过23.5 cm时出现成熟雌性个体;赤点石斑鱼^[34]在5—6月,体长超过20 cm时出现成熟雌性个体;尾纹九棘鲈^[35]成熟雌性个体采集时间在5月,体长在14.9~15.7 cm。本实验中宝石石斑鱼、黑边石斑鱼和赤点石斑鱼体长分别为39.4 cm、32.0 cm和43.4 cm,采样日期在9月初;尾纹九棘鲈体长为14.8 cm,采样日期在8月底。尽管上述各石斑鱼的体长均已接近或超过已有报道中成熟时的体长规格,但性腺发育仍为 Pn 或 Yv 未成熟卵母细胞阶段,可能原因是实验鱼的采样日期均在其繁殖季节之后。已有研究^[36-38]表明,蜂巢石斑鱼的繁殖季节开始于5月,在6月达到峰值,成熟体长为18.1 cm左右。纹波石斑鱼的繁殖季节推断在4—7月,成熟体长为18.9 cm左右^[39]。本实验中蜂巢石斑鱼和纹波石斑鱼由于其采集日期正好在6月的繁殖季节,且体长也达到了成熟规格,因此性腺发育分别为 Sy 和 Ty 成熟阶段。

本实验中6种石斑鱼的性腺发育为未成熟和成熟阶段,且各发育阶段 FSH β 信号均较 LH β 强,推断在石斑鱼性腺发育过程中 FSH β 较 LH β 重要。然而,由于 FSH β 和 LH β 在鱼种中具有物种特异性,因此仅通过免疫信号的强弱无法准确判断 FSH β 和 LH β 在石斑鱼性腺发育过程中的角色。此外,尽管宝石石斑鱼、黑边石斑鱼、赤点石斑鱼和尾纹九棘鲈体长均已接近或超过成熟时的体长规格,但性腺发育仍为未成熟阶段,而蜂巢石斑鱼和纹波石斑鱼为成熟阶段。基于本实验中各石斑鱼性腺发育程度的差异性,因此无法准确判断 FSH β 和 LH β 在石斑鱼成熟和繁殖过程中的角色。已有研究^[8]表明:在成年雌性蜂巢石斑鱼中,LH β 的基因表达和免疫信号均较 FSH β 强;此外,口服 FSH β 激素能诱导蜂巢石斑鱼由雌性逆转为雄性,表明 FSH β 和 LH β 与雌雄性蜂巢石斑鱼的性成熟密切相关。类似的结果也出现在真鲷中,FSH β 可能对其雄性配子的发育起重要作用,而对雌性配子无影响^[20,40]。然而

在点带石斑鱼中,FSH β 和 LH β 免疫信号出现在初级卵母细胞阶段,其角色可能与性分化无关^[7]。此外,在鲑科(*Oncorhynchus*)^[41-44]、星康吉鳗(*Conger myriaster*)^[45]、日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)^[46]和欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[47]中,FSH β 对性腺早期发育如精子和卵子的生长具有重要影响,而 LH β 主要调控性腺发育的成熟阶段如排卵和排精等行为。由于 FSH β 和 LH β 在鱼种中具有多样性和复杂性,因此仅凭免疫信号的强弱无法探讨 FSH β 和 LH β 在石斑鱼发育过程中的角色。进一步的研究还需要结合运用荧光定量分子生物学实验综合讨论 FSH β 和 LH β 在石斑鱼性腺发育过程中的角色。

参考文献:

- [1] LIAO I C, LEAÑO E M. The aquaculture of groupers [M]. Taiwan, China: Asian Fisheries Society, 2008: 1-242.
- [2] 农业农村部渔业渔政管理局,全国水产技术推广总站,中国水产学会. 中国渔业统计年鉴-2020 [M]. 北京:中国农业出版社,2020: 22-23.
Fishery Administration Bureau of Ministry of Agriculture and Rural Areas, National Aquatic Technology Extension Station, The China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020: 22-23.
- [3] NAMBU T. II-7. Seed production and aquaculture technology of red spotted grouper *Epinephelus akaara* [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 2004, 80(6): 1000.
- [4] 李广丽,刘晓春,林浩然. 芳香化酶抑制剂 letrozole 对赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)性逆转的作用[J]. 生理学报, 2005, 57(4): 473-479.
LI G L, LIU X C, LIN H R. Aromatase inhibitor letrozole induces sex inversion in the protogynous red spotted grouper (*Epinephelus akaara*) [J]. Acta Physiologica Sinica, 2005, 57(4): 473-479.
- [5] KAWABE K, KOHNO H. Morphological development of larval and juvenile blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus* [J]. Fisheries Science, 2009, 75(5): 1239-1251.
- [6] CHUDA H. II-6. Seed production and aquaculture technology of longtooth grouper *Epinephelus bruneus* [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 2014, 80(6): 999.
- [7] MURATA R, KOBAYASHI Y, KARIMATA H, et al. The role of pituitary gonadotropins in gonadal sex differentiation in the protogynous Malabar grouper, *Epinephelus malabaricus* [J]. General and Comparative Endocrinology, 2012, 178(3): 587-592.
- [8] KOBAYASHI Y, ALAM M A, HORIGUCHI R. Sexually dimorphic expression of gonadotropin subunits in the pituitary of protogynous honeycomb grouper (*Epinephelus merra*):

- Evidence that follicle-stimulating hormone (FSH) induces gonadal sex change[J]. *Biology of Reproduction*, 2010, 82(6): 1030-1036.
- [9] ZHANG W M, ZHANG Y, ZHANG L H, et al. The mRNA expression of P450 aromatase, gonadotropin β -subunits and FTZ-F1 in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) during 17α -methyltestosterone-induced precocious sex change [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2007, 74(6): 665-673.
- [10] HUR S P, LIM B S, HWANG I J, et al. Masculinization in juvenile longtooth grouper, *Epinephelus bruneus*, with aromatase inhibitor: changes in GtH subunit mRNA expression and steroids hormone levels[J]. *Animal Cells and Systems*, 2012, 16(2): 127-134.
- [11] DE O. GARCIA C E, ARA? JO B C, MELLO P H, et al. Involvement of pituitary gonadotropins, gonadal steroids and breeding season in sex change of protogynous dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Teleostei; Serranidae), induced by a non-steroidal aromatase inhibitor [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 192: 170-180.
- [12] KIM H K, KIM J H, BAEK H J, et al. Gene Expression of aromatases, steroid receptor, GnRH and GTHs in the brain during the formation of ovarian cavity in red spotted grouper, *Epinephelus akaara* [J]. *Development & Reproduction*, 2016, 20(4): 367-377.
- [13] SONG J, NAGAE M, SOYANO K. Changes in plasma vitellogenin and estradiol-17 β levels during the gonadal development of the female Japanese common goby *Acanthogobius flavimanus* [J]. *Aquaculture Science*, 2017, 65(4): 303-310.
- [14] YAMAMOTO K, YAMAZAKI F. Rhythm of development in the oocyte of the gold-fish, *Carassius auratus* [J]. *Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University*, 1961, 12(2): 93-110.
- [15] 崔丹, 刘志伟, 刘南希, 等. 金钱鱼性腺发育及其组织结构观察[J]. *水产学报*, 2013, 37(5): 696-704.
CUI D, LIU Z W, LIU N X, et al. Histological study on the gonadal development of *Scatophagus argus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(5): 696-704.
- [16] 王盈颖. 赤点石斑鱼和青石斑鱼性分化过程中性腺发育的研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2015.
WANG Y Y. Gonad development during sexual differentiation in *Epinephelus akaara* and *E. awoara* [D]. Xiamen: Xiamen University, 2015.
- [17] SHIMIZU A, YAMASHITA M. Purification of mummichog (*Fundulus heteroclitus*) gonadotropins and their subunits, using an immunochemical assay with antisera raised against synthetic peptides [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2002, 125(1): 79-91.
- [18] 魏华, 吴垠. 鱼类生理学[M]. 2版. 北京: 中国农业出版社, 2011: 263-264.
WEI H, WU Y. *Fish physiology* [M]. 2nd ed. Beijing: China Agricultural Press, 2011: 263-264.
- [19] SHIMIZU A, TANAKA H, KAGAWA H. Immunocytochemical applications of specific antisera raised against synthetic fragment peptides of mummichog GtH subunits: examining seasonal variations of gonadotrophs (FSH cells and LH cells) in the mummichog and applications to other acanthopterygian fishes [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2003, 132(1): 35-45.
- [20] GEN K, OKUZAWA K, SENTHILKUMARAN B, et al. Unique expression of gonadotropin-I and-II subunit genes in male and female red seabream (*Pagrus major*) during sexual maturation [J]. *Biology of Reproduction*, 2000, 63(1): 308-319.
- [21] SHIMIZU A, TANAKA H, KAGAWA H. Immunocytochemical applications of specific antisera raised against synthetic fragment peptides of mummichog GtH subunits: examining seasonal variations of gonadotrophs (FSH cells and LH cells) in the mummichog and applications to other acanthopterygian fishes [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2003, 132(1): 35-45.
- [22] PANDOLFI M, LO NOSTRO F L, SHIMIZU A, et al. Identification of immunoreactive FSH and LH cells in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* during the ontogeny and sexual differentiation [J]. *Anatomy and Embryology*, 2006, 211(5): 355-365.
- [23] 舒璇, 刘晓春, 张勇, 等. 赤点石斑鱼脑垂体超微结构的初步研究[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2008, 47(4): 68-71.
SHU H, LIU X C, ZHANG Y, et al. The preliminary study on the ultrastructure of pituitary of *Epinephelus akaara* [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2008, 47(4): 68-71.
- [24] MIRANDA L A, STR? SSMANN C A, SOMOZA G M. Immunocytochemical identification of GtH1 and GtH2 cells during the temperature-sensitive period for sex determination in pejerrey, *Odontesthes bonariensis* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2001, 124(1): 45-52.
- [25] SHIMIZU A, YAMASHITA M. Purification of mummichog (*Fundulus heteroclitus*) gonadotropins and their subunits, using an immunochemical assay with antisera raised against synthetic peptides [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2002, 125(1): 79-91.
- [26] NOBREGA R H, DE JESUS L W O, HONJI R M, et al. Characterization of gonadotropic cells during continuous and seasonal spermatogenesis of two freshwater fish species; a histochemical and immunohistochemical study [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2017, 43(1): 51-63.
- [27] KAGAWA H, KAWAZOE I, TANAKA H, et al. Immunocytochemical identification of two distinct gonadotropic cells (GTH I and GTH II) in the pituitary of Bluefin tuna, *Thunnus thynnus* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1998, 110(1): 11-18.

- [28] GARCÍA AYALA A, VILLAPLANA M, GARCÍA HERNÁNDEZ M P, et al. FSH-, LH-, and TSH-expressing cells during development of *Sparus aurata* L. (Teleostei). An immunocytochemical study [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2003, 134(1): 72-79.
- [29] KASPER R S, SHVED N, TAKAHASHI A, et al. A systematic immunohistochemical survey of the distribution patterns of GH, prolactin, somatolactin, β -TSH, β -FSH, β -LH, ACTH, and α -MSH in the adenohypophysis of *Oreochromis niloticus*, the Nile tilapia [J]. *Cell and Tissue Research*, 2006, 325(2): 303-313.
- [30] GARCÍA HERNÁNDEZ M P, GARCÍA AYALA A, AGULLEIRO B, et al. Development of a homologous radioimmunoassay for *Mediterranean yellowtail* (*Seriola dumerilii*, Risso 1810) LH [J]. *Aquaculture*, 2002, 210(1/4): 203-218.
- [31] ABDUL KADIR N H, MAT PIAH R, AMBAK M A, et al. Reproductive aspects of areolate grouper, *Epinephelus areolatus* and six-barred grouper, *E. sexfasciatus* from Terengganu waters, Malaysia [J]. *AAFL Bioflux*, 2016, 9(6): 1372-1379.
- [32] LIN Y J, ROA-URETA R H, RABAOUI L, et al. Association to vegetated habitats and different vulnerability to habitat degradation for two fish species, *Epinephelus areolatus* (Serranidae) and *Siganus canaliculatus* (Siganidae), from the western Arabian Gulf [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2019, 141: 482-492.
- [33] BARICHE M, HEEMSTRA P. First record of the blacktip grouper *Epinephelus fasciatus* (Teleostei; Serranidae) in the Mediterranean Sea [J]. *Marine Biodiversity Records*, 2012, 5: e1.
- [34] KAYANO Y, ODA T. Growth and spawning of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*, under artificial rearing condition [J]. *Aquaculture Science*, 1994, 42(3): 419-425.
- [35] NAKAI T, SANO M. Evidence of protogynous hermaphroditism in the darkfin hind *Cephalopholis urodeta* (Serranidae) at Iriomote Island, southern Japan [J]. *Fisheries Science*, 2002, 68(3): 697-699.
- [36] LEE Y D, PARK S H, TAKEMURA A, et al. Histological observations of seasonal reproductive and lunar-related spawning cycles in the female honeycomb grouper *Epinephelus merra* in Okinawan waters [J]. *Fisheries Science*, 2002, 68(4): 872-877.
- [37] SOYANO K, MASUMOTO T, TANAKA H, et al. Lunar-related spawning in honeycomb grouper, *Epinephelus merra* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003, 28(1-4): 447-448.
- [38] 左永松, 仲地政人, 中村将, 等. HCG 与 LHRHa 对雌性蜂巢石斑鱼产卵期间生理变化的影响及比较 [J]. *上海海洋大学学报*, 2013, 22(6): 841-848.
- ZUO Y S, NAKACHI M, NAKAMURA M, et al. Impacts of artificial maturation inducing hormone HCG and LHRHa on the physiological fluctuation of female honeycomb grouper, *Epinephelus merra*, during its spawning season and comparison between the two hormones [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2013, 22(6): 841-848.
- [39] OHTA I, EBISAWA A. Reproductive biology and spawning aggregation fishing of the white-streaked grouper, *Epinephelus ongus*, associated with seasonal and lunar cycles [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2015, 98(6): 1555-1570.
- [40] KAGAWA H, TANAKA H, OKUZAWA K, et al. GTH II but not GTH I induces final maturation and the development of maturational competence of oocytes of red seabream in vitro [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1998, 112(1): 80-88.
- [41] TYLER C R, SUMPTER J P, KAWAUCHI H, et al. Involvement of gonadotropin in the uptake of vitellogenin into vitellogenic oocytes of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1991, 84(2): 291-299.
- [42] PLANAS J V, SWANSON P, DICKHOFF W W. Regulation of testicular steroid production in vitro by gonadotropins (GTH I and GTH II) and cyclic AMP in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1993, 91(1): 8-24.
- [43] PRAT F, SUMPTER J P, TYLER C R. Validation of radioimmunoassays for two salmon gonadotropins (GTH I and GTH II) and their plasma concentrations throughout the reproductive cycle in male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Biology of Reproduction*, 1996, 54(6): 1375-1382.
- [44] TYLER C R, POTTINGER T G, COWARD K, et al. Salmonid follicle-stimulating hormone (GTH I) mediates vitellogenic development of oocytes in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Biology of Reproduction*, 1997, 57(5): 1238-1244.
- [45] KAJIMURA S, YOSHIURA Y, SUZUKI M, et al. Changes in the levels of mRNA coding for gonadotropin I β and II β subunits during vitellogenesis in the common Japanese conger *Conger myriaster* [J]. *Fisheries Science*, 2001, 67(6): 1053-1062.
- [46] SUETAKE H, OKUBO K, SATO N, et al. Differential expression of two gonadotropin (GTH) β subunit genes during ovarian maturation induced by repeated injection of salmon GTH in the Japanese eel *Anguilla japonica* [J]. *Fisheries Science*, 2002, 68(2): 290-298.
- [47] MOLÉS G, GÓMEZ A, CARRILLO M, et al. Determination of Fsh quantity and bioactivity during sex differentiation and oogenesis in European sea bass [J]. *Biology of Reproduction*, 2011, 85(4): 848-857.

Gonadal development, pituitary structures and immunohistochemical identification of FSH β and LH β cells in the pituitary in six species of the adult groupers

XU Wengang¹, LIU Liming¹, WANG Jiulong¹, ZOU Huafeng², YU Wensong³, SOYANO Kiyoshi⁴, TANG Yongzheng¹

(1. School of Ocean, Yantai University, Yantai 264005, Shandong, China; 2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Yantai Institute of Marine Economy, Yantai 264003, Shandong, China; 4. Institute for East China Sea Research, Organization for Marine Science and Technology, Nagasaki University, Nagasaki 851-2213, Japan)

Abstract: The pituitary structures and the immune signals of FSH β and LH β of the six fish species (the areolate grouper *Epinephelus areolatus*, blacktip grouper *E. fasciatus*, red spotted grouper *E. akaara*, flagtail grouper *Cephalopholis urodeta*, honeycomb grouper *E. merra* and white-streaked grouper *E. ongus*) widely distributed along the coastline of Japan were investigated. The results showed: the gonadal development of areolate grouper, blacktip grouper, red spotted grouper and flagtail grouper was in the immature stage, however the honeycomb grouper and white-streaked grouper in the mature stage. The pituitary structures consisted of neurohypophysis (NH) and adenohypophysis (AH). The AH was further divided into the rostral pars distalis (RPD), the proximal pars distalis (PPD) and the pars intermedia (PI) from left to right. The immune signals of FSH β and LH β were detected in the PPD area or in the PPD and PI areas in six species, and the FSH β signal intensity was stronger than the LH β signal in six species. These results indicate that, FSH β may play more important roles than LH β in the gonadal development of six species when they were around mature stages. Based on the investigation of the six species of groupers along the coastline of Japan, the information of the interrelation between gonadal development and FSH β and LH β hormones function was obtained which may provide the basic biological data and theoretical basis for resource conservation and artificial propagation.

Key words: adult grouper; gonadal development; pituitary structure; FSH β ; LH β ; immunohistochemistry