

鳊鲮卵黄蛋白的生物效应

姜仁良 谭玉钧 吴嘉敏 王象设
(上海水产大学水产养殖系, 200090)

提 要 鳊鲮卵黄蛋白制备物与血清在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳上分别呈现出 2 条相对应的蛋白区带, 迁移率(R_f)相同。对照组雌鳊经 5 次和 7 次注射 HCG 与 CPG 后, 成熟系数(GSI)分别为 $(11.94 \pm 2.83)\%$ 和 $(46.04 \pm 6.22)\%$, 血清中 17β -雌二醇 (17β -E₂) 浓度为 (0.665 ± 0.431) ng/ml 和 (0.421 ± 0.010) ng/ml, 睾酮(T) 为 (4.602 ± 3.442) ng/ml 和 (3.817 ± 1.399) ng/ml, 经 HCG、CPG 与鳊鲮卵黄蛋白三者混合注射 5 次和 7 次后, GSI 分别为 $(16.53 \pm 6.67)\%$ 和 $(53.23 \pm 11.25)\%$, 血清中 17β -E₂ 浓度为 (1.036 ± 0.316) ng/ml 和 (0.411 ± 0.068) ng/ml, T 为 (11.170 ± 5.818) ng/ml 和 (3.956 ± 1.780) ng/ml。未经注射催情药物的雌鳊 GSI 为 $(0.50 \pm 0.32)\%$, 血清中 17β -E₂ 和 T 浓度低, 检测不出。试验结果证明, 外源性鳊鲮卵黄蛋白与 HCG 和 CPG 三者混合注射具有明显的促进鳊鲮卵巢加速发育成熟的作用。

关键词 鳊鲮, 卵黄蛋白, 17β -雌二醇, 睾酮

鱼类卵子的卵黄蛋白是由卵黄脂磷蛋白和卵黄高磷蛋白组成^[6,7,10]。正在成熟的雌鱼血清中存在一种特异血浆蛋白复合物, 即卵黄蛋白原^[4,9,11]。已经证明卵黄蛋白原是在雌激素的刺激下, 由肝脏合成并进入血液循环, 特定地为发育着的卵母细胞所吸收^[5,11], 并转化成卵黄蛋白。国内有关鱼类卵黄蛋白的生物活性做了一些工作^[2], 至于鳊鲮卵黄蛋白的生物活性和免疫活性未见有报导。本试验以鳊鲮为对象, 分离纯化卵巢的卵黄蛋白, 以它来诱导雌鳊性腺的发育和卵母细胞的成熟, 这对进一步了解鳊鲮的生殖规律, 为人工促进鳊鲮性腺发育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 亲鳊来源

试验用的雌鳊于 1989 年 11 月捕自内河和长江口水域, 然后饲养在海水中。注射催情药物 5 次 (70 d) 和 7 次 (100 d)。体重 170~694g, 体长 57.0~80.0cm。

1.2 卵黄蛋白的分离^[7,14]

取用鳊鲮卵巢加 5 倍体积的 0.5NaCl·5mM EDTA 溶液, 捣碎高速匀浆, 4°C 下离心, 取上清液, 经透析加 3mM PMSF, 50mM Tris-Cl (pH7.5) 混匀后, 盐析沉淀, 重复 1 次, 4°C 下蒸馏水透析, 得卵黄蛋白提取液, -4°C 真空冷冻干燥, 保存备用。

1.3 卵黄蛋白和血清的电泳

卵黄蛋白按 100 μ g (10 μ l) 制样, 血清则加等体积样品处理液, 在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。凝胶浓度为 7.5% (T=7.5%), 交联度为 2% (C=2%), 电流 2mA, 电泳时间 2h。

1.4 $17\beta\text{-E}_2$ 和 T 的测定

应用放射免疫(RIA)检测鳊血清中 $17\beta\text{-E}_2$ 和 T 浓度^[8]。

2 试验结果

2.1 鳊血清和卵黄蛋白的电泳检测

提取的卵巢卵黄蛋白组份在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳上呈现出 2 条蛋白区带, 电泳迁移率(R_f)大的为带 I, 而电泳迁移率小的则为带 II, 表明鳊卵黄蛋白由 2 个组份组成。电泳条件相同情况下, 雌性鳊血清的凝胶电泳, 同样也呈现出 2 条分别与卵黄蛋白相对应的带 I 和带 II, 这 2 条蛋白谱带即为卵黄蛋白原组份。鳊卵黄蛋白与血清卵黄蛋白原对应组份的电泳迁移率也分别相同, 见图 1。

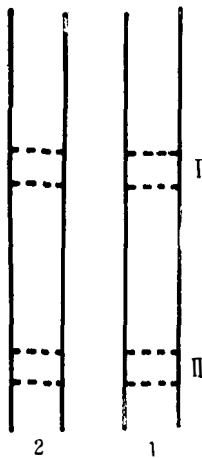


图 1 雌鳊卵黄蛋白(1)和血清(2)的凝胶电泳区带

Fig. 1 The bands of yolk protein (1) and serum (2) of female eel on SDS-gel electrophoresis

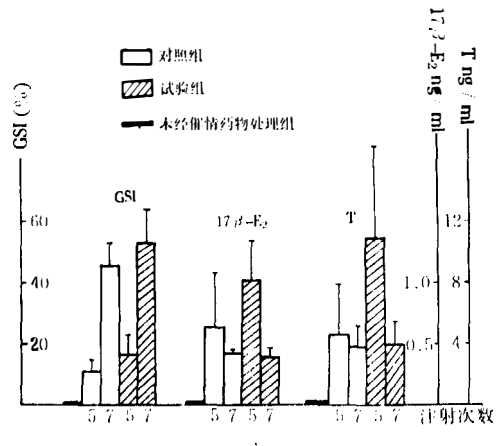


图 2 雌鳊催熟过程中 GSI 和 $17\beta\text{-E}_2$, T 含量变动

Fig. 2 The changes of GSI, $17\beta\text{-E}_2$ and T levels of female eel during induced maturation

2.2 外源性卵黄蛋白对卵巢 GSI、血清中 $17\beta\text{-E}_2$ 和 T 的影响

水温 22°C 时, 未经注射催情药物的雌鳊, GSI 为 $(0.50 \pm 0.32)\%$, 试验组(HCG+CPG+卵黄蛋白)和对照组(HCG+CPG), 各经 5 次和 7 次注射后, 试验组的 GSI 分别为 $(16.53 \pm 6.67)\%$ 和 $(53.23 \pm 11.25)\%$, 对照组的 GSI 分别为 $(11.94 \pm 2.83)\%$ 和 $(46.04 \pm 6.22)\%$ 。试验组和对照组雌鳊的 GSI 都随着注射次数的增加而逐渐升高。前期卵巢发育, 试验组明显快于对照组。经 7 次注射后, 试验组的 GSI 仍然高于对照组, 此时, 雌鳊卵巢接近或已达到完全成熟。

未经注射的雌鳊, 血清中 $17\beta\text{-E}_2$ 和 T 都很低, 未能检测出。经 5 次和 7 次注射后, 试验组血清中 $17\beta\text{-E}_2$ 的浓度分别为 $(1.036 \pm 0.316)\text{ng/ml}$ 和 $(0.411 \pm 0.068)\text{ng/ml}$, T 为 $(11.170 \pm 5.818)\text{ng/ml}$ 和 $(3.956 \pm 1.780)\text{ng/ml}$; 对照组血清中 $17\beta\text{-E}_2$ 的浓度分别为 $(0.665 \pm 0.43)\text{ng/ml}$ 和 $(0.421 \pm 0.010)\text{ng/ml}$, T 为 $(4.602 \pm 3.442)\text{ng/ml}$ 和 $(3.817 \pm 1.399)\text{ng/ml}$ 。试验组血清中 $17\beta\text{-E}_2$ 和 T 浓度都高于对照组。雌鳊卵巢发育达到完全成熟时, 血清中 $17\beta\text{-E}_2$ 和 T 浓度均呈现下降趋势。见图 2 和表 1。

表 1 雌鳊 GSI 和 $17\beta\text{-E}_2$, T 含量的变化
Table 1 The changes of GSI, $17\beta\text{-E}_2$ and T levels of female ell

组 别	注射次数	GSI (%)	$17\beta\text{-E}_2$ (ng/ml)	T (ng/ml)	尾数 (N)
未经注射催情药物组		0.50 ± 0.32	ND	ND	5
对 照 组	5	11.94 ± 2.83	0.665 ± 0.431	4.602 ± 3.442	
HCG+CPG	7	46.04 ± 6.22	0.421 ± 0.010	3.817 ± 1.899	10
试 验 组	5	16.53 ± 6.67	1.036 ± 0.316	11.170 ± 5.818	
HCG+CPG					8
+ 鳊鲮卵黄蛋白	7	53.23 ± 11.25	0.411 ± 0.068	3.956 ± 1.780	

注: 1. 鲤垂体 (CPG); 2. 注射剂量 HCG200I.U.+CPG1.0mg/尾 (对照组); 鳊鲮卵黄蛋白 25mg+HCG200I.U.+CPG1.0mg/尾 (试验组); 3. ND 检测不出。

3 讨 论

3.1 卵母细胞发育成熟对卵黄蛋白需求的种属特异性

雌性鳊鲮卵巢发育成熟系数远较鲤科鱼类为高,一般可达到 50.0% 左右^[1],而鲤科鱼类成熟系数都在 25.0% 左右,反映了鳊鲮对营养物质的高需求,这可能正是外源性卵黄蛋白能够促进鳊鲮性腺发育的基础之一。当分离鳊鲮卵巢时,发现卵黄蛋白含脂量较高,可以认为雌性鳊鲮卵母细胞发育成熟需要较高卵黄脂磷蛋白,这是鳊鲮细胞发育成熟的种属特异性。

鳊鲮卵巢的卵黄蛋白和血清的卵黄蛋白原分别经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,出现相同迁移率的 2 条对应蛋白区带(带 I 和带 II)。Hara 等 (1980) 也证实鳊鲮卵黄蛋白与卵黄蛋白原有相同的抗原性和具有相同的分子量,看来,雌性鳊鲮卵黄蛋白原转化成卵黄蛋白的代谢过程与其他鱼类可能有所差异^[7],其肽键改造程度相对较低。因此,用同种外源性卵黄蛋白诱导鳊鲮卵母细胞发育成熟,更具有种属特异性的生物效应。

3.2 外源性鳊鲮卵黄蛋白的生物效应

雌性鳊鲮长期蓄养在海水中,卵巢不会发育,成熟系数无甚增加^[1]。经催情药物刺激后,成熟系数和血清 $17\beta\text{-E}_2$ 和 T 明显地升高。试验结果表明,外源性鳊鲮卵黄蛋白,对鳊鲮具有明显的诱导卵母细胞发育成熟的作用。经 5 次和 7 次注射后,试验组 3 项参数 (GSI、 $17\beta\text{-E}_2$ 和 T) 都明显高于对照组。外源性卵黄蛋白被卵母细胞直接吸收,促进性腺发育,因为鳊鲮卵黄蛋白原在结构上有一定的相似性。另一方面,外源性卵黄蛋白能促进增高血清中 $17\beta\text{-E}_2$ 的浓度,刺激肝脏的卵黄蛋白原合成的增加,从而加速卵母细胞的卵黄积累^[8,12,13]。当卵黄积累一旦完成后,卵巢丰满, GSI 达到高峰 (53.23 ± 11.25)% 时, $17\beta\text{-E}_2$ 反而下降至低水平 (0.411 ± 0.068) ng/ml, 证明鳊鲮血清中 $17\beta\text{-E}_2$ 浓度变化规律与卵母细胞卵黄积累的相关性,与其他鱼类相仿^[8]。至于血清中的 T 浓度也呈现出随卵巢发育而变化的趋势,因为 T 是 $17\beta\text{-E}_2$ 的前体,所以血清中 T 浓度的变动,也同样反映出对雌性鳊鲮卵巢发育的进程影响。总之,外源性卵黄蛋白与其他催情药物混合注射是诱导鳊鲮卵母细胞卵黄积累和最终成熟的有效途径。

参 考 文 献

- [1] 王义强等, 1980. 河鲤人工繁殖的初步研究. 水产学报, 4(2):147—156.
- [2] 王浩, 刘荣臻, 1989. 雌性特异蛋白质复合物促黄雌性腺发育, 提高黄雌孵化率. 水产学报, 13(4):353—355.
- [3] 姜仁良等, 1986. 促黄体生成素释放激素类似物对团头鲂血清中, 促性腺激素和 17β -雌二醇含量变动研究. 水产学报, 10(2):185—193.
- [4] Aida, K. et al., 1973. Physiological studies on gonadal maturation of fishes—I sexual difference in composition of plasma protein of Ayu in relation to gonadal maturation. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 39(11):1091—1106.
- [5] ———, 1973. Physiological studies on gonadal maturation of fishes—II histological changes in the liver cell of Ayu following gonadal maturation and estrogen administration. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 39(11):1107—1116.
- [6] Bergink, E. W. and R. A. Wallace, 1974. Precursor-Product relationship between amphibian vitellogenin and phosphitin. *J. Biol. Chem.*, 249:2897—2903.
- [7] De Vlaming, V. L. et al., 1980. Goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin: induction, isolation, properties and relationship to yolk proteins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 67B:613—623.
- [8] Hara, A. et al., 1980. Studies on female-specific serum protein (vitellogenin) and egg yolk protein in Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 65B:315—320.
- [9] Hori, S. H. et al., 1979. Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgens. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 37:306—320.
- [10] Jared, D. W. and R. A. Wallace, 1968. Comparative chromatography of the yolk proteins of teleosts. *Comp. Biochem. Physiol.*, 24:437—443.
- [11] Nath, P. and B. I. Sundararajai, 1981. Induction of vitellogenesis in the hypophysectomized catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch): Effects of piscine and mammalian hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 43:191—200.
- [12] Sundararaj, B. I. and P. Nath, 1981. Steroid-induced synthesis of vitellogenin in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 43:201—210.
- [13] Sundararaj, B. I. et al., 1982. Synthesis of vitellogenin and its uptakes by the ovary in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) in response to carp gonadotropin and its subunits. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 46:93—98.
- [14] Wiley, H. S. et al., 1979. New methods for the purification of vertebrate vitellogenin. *Analytical Biochemistry*, 97:145—156.

BIOLOGICAL EFFECTS OF YOLK PROTEIN OF JAPANESE EEL (*ANGUILLA JAPONICA*)

Jiang Ren-liang, Tan Yu-jun, Wu Jia-min and Wan Xiang-she

(Department of Aquaculture, SFU, 200090)

ABSTRACT Both yolk protein preparation (YPP) and serum of Japanese eel (*Anguilla japonica*) showed two bands on SDS-gel electrophoresis, and R_f values of two bands of YPP were similar to that of two bands of serum. Five and seven injections with HCG+CPG were given to female eels of control group, females showed $(11.94 \pm 2.83)\%$ and $(46.04 \pm 6.22)\%$ respectively in GSI, (0.665 ± 0.431) ng/ml and (0.411 ± 0.010) ng/ml in serum 17β -oestradiol (17β -E₂) levels, (4.602 ± 3.442) ng/ml and (3.817 ± 1.399) ng/ml in serum testosterone (T) levels. Five and seven injections with HCG+CPG+YPP were given to females of experimental group, GSI reached to $(16.53 \pm 6.67)\%$ and $(53.23 \pm 11.25)\%$ respectively, serum 17β -E₂ were (1.036 ± 0.316)

ng/ml and (0.411 ± 0.068) ng/ml, serum T were (11.170 ± 5.818) ng/ml and (3.956 ± 1.780) ng/ml. Non-injection females, GSI was $(0.50 \pm 0.32)\%$, serum 17β -E₂ and T levels were undetectable. These results indicated that exogenous eel YPP+HCG+CPG mixed injection showed significant stimulation on ovarian development and maturation.

KEYWORDS *Anguilla japonica*, yolk protein, 17β -oestradiol, testosterone