

四眼斑水龟血浆生殖激素季节性变化

傅丽容^① 贺斌^① 洪美玲^① 史海涛^{①②*}

(^① 海南师范大学生物学系 海口 571158; ^② 中国科学院成都生物研究所 成都 610041)

摘要: 为了进一步探讨四眼斑水龟 (*Sacalia quadriocellata*) 的繁殖生理周期和生殖激素分泌特征, 使用放射免疫分析测定法 (RIA) 分别测定了 8 月 (夏季)、10 月 (秋季)、1 月 (冬季)、3 月 (春季) 四眼斑水龟血浆中卵泡刺激素 (FSH)、促黄体生成素 (LH)、睾酮 (T)、雌二醇 (E₂)、孕酮 (P) 五种生殖激素的含量。结果显示, 四眼斑水龟生殖激素分泌呈现较明显的周期性, 激素水平与环境温度的变化有关; 雄性 T 含量夏季开始升高, 秋季达到高峰, 与精子的发生和成熟同步; 雌性 T 水平升高促进其接受雄性爬胯, 且作为雌激素合成的前体物质, 间接作用于雌激素的合成; 排卵会出现 LH 峰, E₂ 含量排卵前几个月开始增长, 刺激肝生成卵黄; 排卵期间 P 含量较高, 可能在排卵过程中发挥作用。

关键词: 四眼斑水龟; 促性腺激素; 性腺激素; 血浆

中图分类号: Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2008)03-56-04

Seasonal Changes of Reproductive Hormones in the Plasma of Four Eye-spotted Turtle, *Sacalia quadriocellata*

FU Li-Rong^① HE Bin^① HONG Mei-Ling^① SHI Hai-Tao^{①②*}

(^① Department of Biology, Hainan Normal University, Haikou 571158;

^② Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract: In this paper, the plasma gonadotropins including follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), gonadal steroids testosterone (T), estradiol (E₂) and progesterone (P) of freshly captured Four Eye-spotted Turtle (*Sacalia quadriocellata*) were measured using a radio-immunoassay (RIA) method. The result shows that: The reproductive hormones in plasma displayed a distinct seasonal cycles. The plasma gonadal steroids levels are correlation to environmental temperature, as highest during summer and autumn, lowest in winter. Plasma T elevated during the period gonadal maturation and spermatogenesis occur. In female, there was a preovulatory LH surge and T rise during mating period, which probably is related to receptivity and coincided with ovarian maturation. Female E₂ levels increased prior to mating season and appeared to stimulate vitellogenin production by liver. A sharp surge of P displayed during mating period (autumn) which coincided with the timing of ovulation.

Key words: *Sacalia quadriocellata*; Plasma gonadotropins; Plasma gonadal steroids; Plasma

四眼斑水龟 (*Sacalia quadriocellata*) 繁殖能力低, 抵抗力弱, 容易染病, 加上近年来过度猎捕、栖息地破坏、龟类贸易猖獗等原因, 分布范围和种群数量大为缩减^[1,2], 已被中国濒危动物红皮书列为濒危等级^[3]。有关该物种的繁殖生物学资料报道主要有野外观察^[1]、饲养观察^[4]、生殖系统解剖^[5]和性腺组织学季节性变化研

究^[6,7]等, 未见生殖激素水平测定的报道。国内仅胡增高测定了乌龟 (*Chinemys reevesii*)、黄喉

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 30260019);

* 通讯作者, E-mail: haitao-shi@263.net;

第一作者介绍 傅丽容, 女, 高级实验师; 从事动物解剖生理学研究; E-mail: flr@hainnu.edu.cn.

收稿日期: 2007-10-23, 修回日期: 2008-03-01

水龟(*Clemmys mutica*)、中华鳖(*Trionyx sinensis*)等龟鳖动物血浆中性激素的含量^[8,9]。国外学者利用行为观察、生殖系统解剖、使用B超技术(ultra-sound scanning)检查卵泡发育状况、性腺组织切片观察和血液生殖激素含量测定等方法,并结合环境因子的变化,研究了多种陆龟^[10,11]、淡水龟^[12,13]和海龟^[14]的繁殖周期。血浆生殖激素含量的周期变化,对动物的性腺发育、发情交配、排卵、受精以及胚胎发育是必不可少的,这方面的研究有助于了解动物的生殖生理状态,理解动物生殖内分泌的调节以及在饲养繁殖中的应用。鉴于此,作者使用放射免疫分析测定法测定了不同季节四眼斑水龟血浆生殖激素含量,结合组织学和行为学等内容,研究其繁殖周期及激素相互调节关系,为该物种的养殖和保护提供科学的理论依据。

1 材料与方 法

分别于2002年8月(夏季)、10月(秋季)和2003年1月(冬季)、3月(春季),分四次从海南琼中县湾岭地区(N19°08',E109°57')龟贸易商处购买四眼斑水龟16只。每个季节4只,雌雄各2只,均为成体。雄性体重(204.75±16.01)g,雌性体重(243.18±15.75)g。带回实验室后

立即对个体进行测量并解剖,从心脏取血3~5ml注入经肝素钠抗凝的试管中,使用XYJ80-2离心机1500~2000r/min离心15~20min,冷藏待检。使用放射免疫分析试剂盒(RIA法),分别测定促性腺激素卵泡刺激素(FSH)、促黄体生成素(LH)和性腺激素睾酮(T)、雌二醇(E₂)、孕酮(P)五种生殖激素的含量,详细操作参考Licht等的方法^[15]。试剂盒为上海史瑞可生物科技有限公司生产,人用。因本物种属濒危物种,实验均需处死,故实验使用的样本量较少,无法进行统计分析。

2 结 果

雌雄个体促性腺激素含量均较低。雄性FSH含量季节性波动不明显;LH水平春季最高,其他季节水平较低;秋季T水平明显高于其他月份(表1)。雌性FSH春、秋季相对较高,夏、冬季水平较低;雌性血浆中LH秋季最高,其他季节由于含量太低导致检测结果为0;夏、秋季E₂水平最高,之后逐渐减少,春季最低;P秋季出现非常明显的高峰,其他季节水平较低;秋季血浆T维持较高水平,冬季T的检测结果为0(表1)。

表1 不同季节四眼斑水龟血浆生殖激素浓度的比较

Table 1 The comparison of reproductive hormones concentration in plasma of *S. quadriocellata* in different season

| 测定时间 Mensuration time (年·月 Year·month) | 标本号 Specimen No. | 性别 Sex | FSH (mIU/ml) | LH (mIU/ml) | T (ng/ml) | E ₂ (pg/ml) | P (ng/ml) |
|---|------------------|--------|-----------------|----------------|--------------|---------------------------|--------------|
| 2002-08 | 286 | ♂ | 0.27 | 0.00 | 1.23 | | |
| | 236 | ♂ | 0.10 | 0.11 | 0.84 | | |
| | 287 | ♀ | 0.00 | 0.00 | 0.17 | 30 | 0.31 |
| | 272 | ♀ | 0.00 | 0.00 | 0.78 | 126 | 0.50 |
| 2002-10 | 38 | ♂ | 0.64 | 0.03 | 9.40 | | |
| | 12 | ♂ | 0.00 | 0.16 | 6.60 | | |
| | 35 | ♀ | 0.46 | 0.13 | 0.45 | 72 | 72.2 |
| | 33 | ♀ | 0.56 | 0.16 | 1.00 | 75 | 66.7 |
| 2003-01 | 169 | ♂ | 0.28 | 0.26 | 0.00 | | |
| | 217 | ♂ | 0.94 | 1.60 | 1.70 | | |
| | 188 | ♀ | 0.05 | 0.00 | 0.00 | 51 | 0.24 |
| | 267 | ♀ | 0.26 | 0.00 | 0.00 | 47 | 0.06 |
| 2003-03 | 194 | ♂ | 0.35 | 0.09 | 0.25 | | |
| | 281 | ♂ | 0.57 | 0.00 | 0.36 | | |
| | 264 | ♀ | 0.54 | 0.00 | 0.14 | 21 | 1.18 |
| | 231 | ♀ | 0.38 | 0.00 | 0.55 | 11 | 3.20 |

3 讨论

与其他学者相关的研究成果进行比较, 雄性个体血浆 T 浓度的范围, 沙漠地鼠陆龟 (*Gopherus agassizii*) 为 18.37~243.60 ng/ml^[11], 乌龟为 0.06~0.35 ng/ml^[7], 本次测定的雄性四眼斑水龟 T 浓度为 0.25~9.40 ng/ml。三者血浆同种激素含量差别达数个数量级, 可能有三个原因, 一是龟鳖类血浆生殖激素含量物种间差异较大; 二是使用的分析试剂盒不同导致差异; 另外, Rostal 等^[11] 研究沙漠地鼠陆龟时, 使用的实验动物是野生个体并在捕捉后立即取血, 本实验使用的动物血样及胡增高^[7] 研究的乌龟血样均在捕捉多天后方才解剖取血, 国外很多研究表明, 野生龟类被捕捉后, 由于应激反应和胁迫条件, 龟类的肾上腺酮激素 (corticosterone) 含量增加, 抑制了睾丸功能, T 分泌减少, 血浆性激素水平大幅下降^[16,17], 所以后两者的激素水平相对较低。

综合本课题组在野外观察和系统解剖、组织学观察的结果, 四眼斑水龟的繁殖行为、生殖器官和组织学结构均具明显的年周期性变化, 本实验结果显示生殖激素分泌也呈现较明显的周期性, 与其组织结构及行为的变化一致。四眼斑水龟的求偶交配行为发生在秋季^[7], 组织学观察发现夏季和秋季雄性个体睾丸间质细胞最多^[7], 间质细胞可以合成和分泌 T 等雄性激素, 秋季达到高峰, T 的分泌促进了精子的发生, 精子成熟, 充盈附睾, 表现出强烈求偶交配行为。秋季过后, 交配期结束^[7], 血浆 T 水平下降, 性腺开始萎缩。四眼斑水龟秋季开始排卵, 雌性 FSH 的分泌夏季开始增长, 随后秋季 LH 开始增加, 可能是出现排卵前 LH 峰的缘故, 这与兽类的研究结果相似^[18]。夏、秋季 T 水平升高使雌性接受雄性爬跨, 多种龟均有所体现^[10]。卵泡的内膜细胞和颗粒细胞共同参与雌激素的合成, 内膜细胞在 LH 作用下产生雄烯二酮, 通过扩散转运至颗粒细胞, 在 FSH 作用下增强颗粒细胞内芳香化酶的活性, 从而把雄激素转变为雌激素, 即 T 作为 E₂ 的合成前

体, 间接作用于卵黄形成和卵泡的成熟^[10,11]。E₂ 夏季最高, P 秋季出现高峰, 与雌性生殖器官发育和卵泡发育是一致的。卵泡膜内层细胞随着卵泡的生长发育逐渐增多, 有些特化形成卵泡腺, 卵泡腺可能是雌激素来源之一; 秋季有些大卵泡闭锁, 闭锁后形成黄体为其他卵泡生长发育提供必需的激素, 这是雌激素来源之二; 另外卵巢排卵后出现明显的持久性的黄体, 从而保证了从卵泡生长发育到排卵的整个过程的激素供应^[6]。多种龟鳖实验证明, 雌性个体 E₂ 含量排卵前几个月开始增长, 刺激肝形成特殊的结合钙的磷脂蛋白, 并掺入卵内生成卵黄^[9~11], 随着产卵的结束, 春季 E₂ 降到最小值。排卵季节 P 含量较高, 支持了 Rostal 等人的推测, 即 P 在龟鳖类排卵过程中起作用^[10]。

为了研究四眼斑水龟繁殖周期与气温变化的关系, 选择了气温最低的 1 月, 气温开始升高的 3 月, 气温最高的 8 月, 气温开始下降的 10 月进行实验。国外学者通过野外观察和生理学研究认为温度是影响龟类生精作用及卵巢发育的主要因素, 大部分物种性腺发育受环境相对高温的控制, 同样, 激素分泌高峰也出现在温度较高的季节^[19], 这与个体的代谢速率有关, 较高的环境温度有利于物质合成和运输。本实验的结果反映四眼斑水龟的性激素在夏季和秋季含量维持较高水平, 随着温度的降低, 10 月份以后激素含量开始下降, 冬季所有性激素含量最低, 符合一般规律。对于四眼斑水龟的生殖生理周期, 受生殖激素的作用, 雄性个体春季性腺开始发育, 雌性主要是夏季开始发育, 这与对锦龟 (*Chrysemys picta*) 的研究结果相似, 其研究者对此现象的解释是该物种雌雄性腺发育的最适温度不同, 雄性低于雌性^[20]。是否四眼斑水龟具有类似机制, 有待进一步实验研究。

参 考 文 献

- [1] 史海涛, 符有利, 汪继超. 四眼斑水龟之迷. 人与生物圈, 2002, 6: 33~39.
- [2] 龚世平, 史海涛, 谢才坚等. 海南黎母山四眼斑水龟对春季生境的选择性. 动物学研究, 2005, 24(2): 142~

- 146.
- [3] 赵尔宓. 中国濒危动物红皮书 两栖爬行类. 北京: 科学出版社, 1998, 86~172.
- [4] 周婷. 四眼斑水龟在人工饲养条件下的生态. 中国龟鳖研究, 1997, **15**(增刊): 147~150.
- [5] 傅丽容, 洪美玲, 史海涛等. 四眼斑水龟的泄殖系统解剖. 动物学杂志, 2004, **39**(3): 68~71.
- [6] 傅丽容, 洪美玲, 史海涛等. 四眼斑水龟雌性生殖器官组织结构的季节变化. 四川动物, 2006, **25**(2): 360~363.
- [7] 傅丽容, 洪美玲, 史海涛等. 四眼斑水龟雄性生殖器官的季节变化. 水产科学, 2007, **26**(2): 109~112.
- [8] 胡增高. 乌龟血中性激素季节性变化的研究. 两栖爬行动物学报, 1987, **6**(2): 66~68.
- [9] 胡增高. 三种龟鳖目动物性激素季节性变化的比较研究. 动物学研究, 1990, **11**(3): 209~213.
- [10] Rostal D C, Robeck T R, Grumbles J S, et al. Seasonal reproductive cycle of the Galápagos Tortoise (*Geochelone nigra*) in captivity. *Zoo Biology*, 1998, **17**: 505~517.
- [11] Rostal D C, Lance V A, Grumbles J S, et al. Seasonal reproductive cycle of the desert tortoise (*Gopherus agassizii*) in the Eastern Mojave Desert. *Herpetological Monographs*, 1994, **8**: 72~82.
- [12] Licht P, Breitenbach G L, Congdon J D. Seasonal cycles in testicular activity, gonadotropin, and thyroxine in the painted turtle. *Chrysemys picta*, under natural conditions. *General and Comparative Endocrinology*, 1985, **59**: 130~139.
- [13] Mendonca M T, Licht P. Seasonal cycles in testicular activity, gonadotropin, and thyroxine in the musk turtle. *Sternotherus odoratus*. *General and Comparative Endocrinology*, 1986, **62**: 459~469.
- [14] Wibbels T, Owens D W, Licht P. Seasonal changes in serum gonadal steroids associated with migration, mating, and nesting in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *General and Comparative Endocrinology*, 1990, **79**: 154~164.
- [15] Licht P, McCreery B R, Barnes R, et al. Seasonal and stress related changes in plasma gonadotropins, six steroids, and corticosterone in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *General and Comparative Endocrinology*, 1983, **50**: 124~145.
- [16] Gregory L F, Gross T S, Bolten A B, et al. Plasma corticosterone concentrations associated with acute captivity stress in wild loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *General and Comparative Endocrinology*, 1996, **104**: 312~320.
- [17] Mahmoud I Y, Licht P. Seasonal changes in gonadal activity and the effects of stress on reproductive hormones in the common snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *General and Comparative Endocrinology*, 1997, **107**: 359~372.
- [18] 朱士恩. 动物生殖生理学. 北京: 中国农业出版社, 2006, 72.
- [19] Scheramm B G, Lance V A, Casares M. Reproductive cycle of male and female Giant Tortises (*Geochelone nigra*) on the Galápagos islands by plasma steroid analysis and ultrasound scanning. Linnaeus fund research report. *Chelonian Conservation and Biology*, 1999, **3**(3): 523~528.
- [20] Ganzhorn D, Licht P. Regulation of seasonal gonadal cycles by temperature in the painted turtle. *Chrysemys picta*. *Copeia*, 1983, (2): 347~358.

欢迎订阅《动物学杂志》

《动物学杂志》是中国科学院动物研究所、中国动物学会主办的科技期刊,亦是中國自然科学核心期刊。主要报道动物学领域的最新研究成果,介绍有创见的新思想、新学说、新技术、新方法。报道范围既有宏观生态研究,又有微观实验技术。报道层次既有科学前沿性、资料性的,也有技术性、知识性的。稿件内容涉及范围广,实用性强,主要栏目有:研究报告、珍稀濒危动物、技术与方法、研究简报和快讯、科技动态等等。读者对象为动物科学领域的研究、教学、技术、管理人员及广大业余爱好者。

近年,《动物学杂志》各项统计指标有了很大的提高,是国内各大数据库及国外著名数据库英国《动物学记录》、美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》收录的源期刊。

《动物学杂志》双月刊,16开,112页,2008年每册定价30元,全年180元,国内外公开发行。国内邮发代号:2-422;国外发行代号(Code No.):BM58。全国各地邮局均可订阅。如未能在当地邮局订到,可与编辑部直接联系。本刊对在校学生及个人订户7折优惠(直接与编辑部联系订阅)。

地址:北京市朝阳区大屯路 中国科学院动物研究所内《动物学杂志》编辑部;邮编:100101。

电话:(010)64807162; E-mail: journal@ioz.ac.cn。网址:bird.chinajournal.net.cn; dwzz.ioz.ac.cn。

欢迎投稿,欢迎订阅,欢迎刊登广告。