

高效能的促黄体素释放激素类似物 对金鱼促性腺激素分泌的作用*

林 浩 然

(中山大学生物系)

R. E. 彼得, C. S. 娜霍奈克, O. 布雷斯

(加拿大, 阿尔伯塔大学动物系)

提 要

金鱼对 LRH-A 反应有明显的季节性变化, 在早春(2月)生殖季节开始前诱导的血清 GtH 含量最高; 在生殖季节过后(5—6月)GtH 的释放反应减弱, 而在夏季(8月)性腺处于退化状况时, 反应很弱或者没有反应。LRH-A 注射剂量的高低对血清 GtH 含量增高的影响并不都很明显, 但高剂量(1.0 微克/克体重)能诱导较高的血清 GtH 含量并能维持 24 小时。经过多次注射高剂量以后, 脑垂体 GtH 含量下降。温度、注射剂量、注射间隔时间都和诱导的血清 GtH 含量有密切关系。连续 9—10 天每日注射 LRH-A, 能刺激性腺退化的金鱼恢复性腺发育, 但对性腺已开始发育的金鱼, 却抑制或减慢其性腺进一步发育。

目前已经知道硬骨鱼类也有促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)^[1,2]。虽然硬骨鱼类 GnRH 的化学结构和哺乳类的促黄体素释放激素(LRH)不同^[7];但是, 人工合成的 LRH 能够刺激硬骨鱼类促性腺激素(GtH)的分泌^[3,4,10,13]。由于 LRH 和它的类似物对促进养殖鱼类的生殖有很大的实际应用价值^[1,2], 深入了解它们对这类化合物的反应特点就十分重要。本文着重研究季节、温度、剂量、注射次数和注射间隔时间等对金鱼在注射 LRH-A 后 GtH 释放反应的影响。

材 料 和 方 法

用体长 7—10 厘米的金鱼(*Carassius auratus*), 在温度为 12—14°C, 光照为 16 小时光亮 8 小时黑暗的 96 立升流水池中驯养两星期以上, 每天随意投喂鲑鳟鱼类食用的商品颗粒饲料两次。每年 8 月到 12 月, 金鱼性腺处于退化或不成熟状况, 1 月到 3 月处于发育成熟状况, 雄鱼有成熟精子, 雌鱼卵细胞完成卵黄生成阶段, 4 月到 6 月初为性腺发育成熟与产卵时期, 6 月下旬以后性腺又渐趋退化。根据试验要求, 我们在各个不同季节选择性腺发育状况不同的雌鱼或雄鱼进行试验。

* 本文是林浩然 1981 年在加拿大阿尔伯塔大学进修期间和 R. E. 彼得教授等合作的。

编辑部收到稿件日期: 1982 年 2 月。

将促黄体素释放激素类似物 (des-Gly¹⁰-(D-Ala⁶)-LRH ethylamide, LRH-A) 用淡水硬骨鱼类生理盐水 (PS) 配制成剂量为 0.01 (以下称低剂量)、0.1 (以下称中剂量) 和 1.0 (以下称高剂量) 微克/克鱼体重的溶液。腹腔注射, 注射容量为 5 微升/克鱼体重。对照组以同样方式注射 PS。各试验组的金鱼为 6—7 尾。

分别在开始注射 LRH-A 之前和最后一次注射后的一段时间 (一般为注射后的 6、24 小时) 从金鱼尾部血管抽取血样, 以供测定血液的 GtH 含量。金鱼在注射和抽取血样时用 MS-222 (tricaine methanesulfonate) 溶液轻度麻醉。血样在 4℃ 中离心 20 分钟, 取血清样品加入 1 微升 1% 的 thiomerosolate 溶液以预防可能的细菌分解作用, 然后以干冰保存或贮存于 -28℃ 中。部分试验组在金鱼抽取最后一次血样后取出脑垂体制成匀浆样品, 以供测定 GtH 含量。所有金鱼在抽取血样后均称体重和性腺重, 并计算性腺成熟系数 (GSI)。

血清 GtH 含量是采用以提纯的鲤鱼 GtH(c-GtH) 做为标准以及兔抗 c-GtH 血清做为抗体的放射免疫方法测定。

提纯的 c-GtH 采用标准的氯胺-T 法进行¹²⁵I 标志 (Greenwood 等)^[6]。在交联葡聚糖 G-50 的 1 × 10 厘米柱上进行层析, 使¹²⁵I-c-GtH 和无机的¹²⁵I 分离。然后, 采用伴刀豆球蛋白 A-琼脂糖吸收法将¹²⁵I-c-GtH 的糖蛋白部分和非糖蛋白部分分离: 非糖蛋白部分先用 pH8.6 的巴比妥缓冲液洗脱, 然后用含有 0.15M 1-O-甲基-α-D-吡喃葡萄糖苷的巴比妥缓冲液将糖蛋白的 c-GtH 洗出。这样, 用放射免疫测定的就是所谓 “Con-AII” 的糖蛋白 GtH, 与 Ng 和 Idler^[8,9] 所叙述的相当。放射免疫的测定, 系根据 Crim 等^[5] 的具体步骤和方法。

采用 Kruskal-Wallis 方差分析来确定各个试验组之间血清 GtH 水平的显著性差别, 然后用 Mann-Whitney U-试验法对各试验组的测定结果 (列出平均值±标准误差) 进行比较。

主 要 结 果

1. 金鱼对 LRH-A 反应的季节性

在 2 月、5—6 月、8 月和 11 月, 用性腺发育状况不同的雄金鱼进行了 4 次试验。每次试验均包括 3 组: 第一组以 12 小时间隔两次注射 LRH-A; 第二组以 12 小时间隔两次注射 LRH-A; 2 天后, 又以同样的时间间隔再注射两次; 第三组以 12 小时间隔两次注射 LRH-A, 共重复进行 3 次, 每次均间隔两天 (图 1)。每组试验金鱼共 28 尾, 再分为 4 个小组, 分别注射高剂量, 中剂量和低剂量 LRH-A, 对照组注射 PS。

试验结果表明, 金鱼对 LRH-A 反应有明显的季节性变化。在 2 月, 生殖季节刚开始前注射 LRH-A 后诱导的血清 GtH 含量最高。如在第一组, 低剂量和中剂量两次注射后 6 小时, 血清 GtH 含量是 35 毫微克/毫升, 高剂量是 55 毫微克/毫升; 而中剂量和高剂量两次注射后 24 小时, 血清 GtH 含量分别增高为 55 和 110 毫微克/毫升 (图 2)。

在 5 月末到 6 月初, 旺盛的生殖季节刚结束, 金鱼对 LRH-A 的 GtH 释放反应减弱, 表现为注射 LRH-A 后诱导的血清含量低于生殖季节刚开始时。如在第一组, 各不同剂

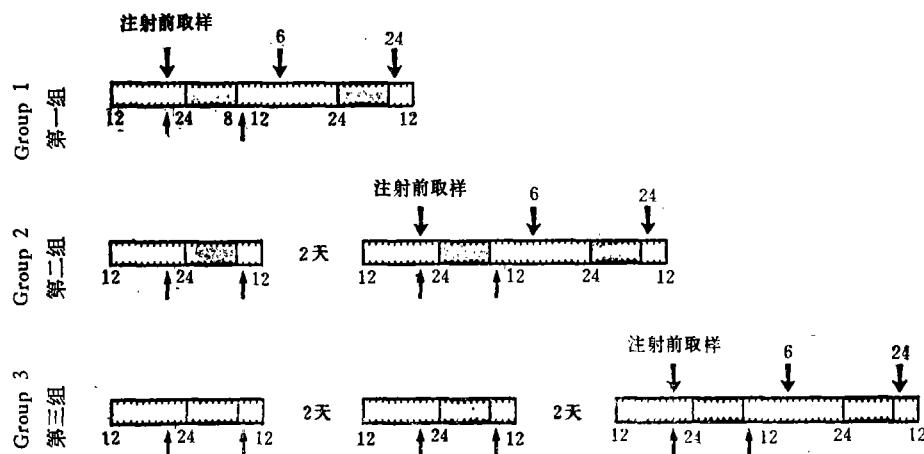


图1 测定金鱼对LRH-A的GtH释放反应的试验安排(图中数字表示时间，
小箭头表示注射时间，大箭头表示取血样时间)

Fig. 1 Outline of the protocol for the experiments.(The number beside each arrow indicates blood sampling time (↓) or time of injection (↑))

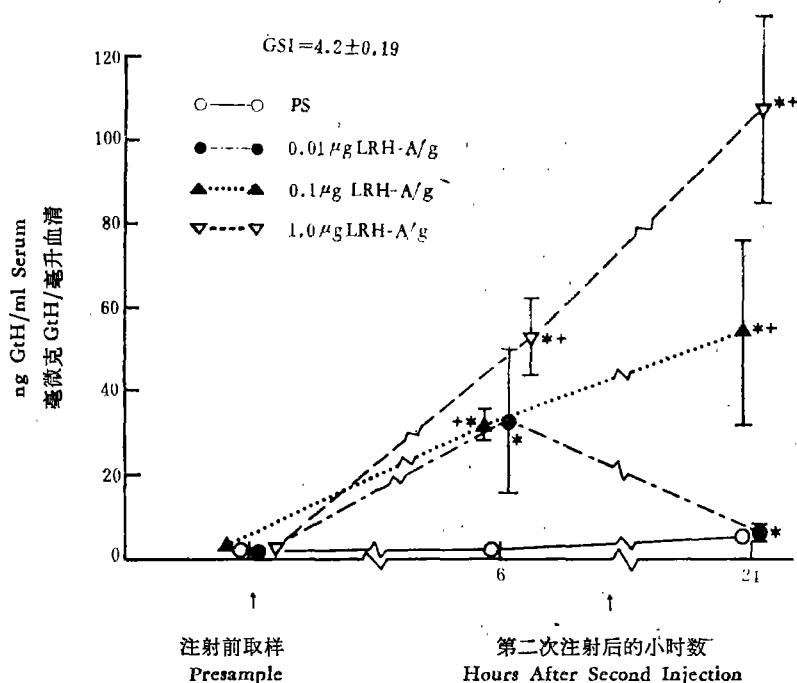


图2 早春(2月)生殖季节刚要开始前, 12小时间隔两次注射LRH-A后(即试验的第一组), 雄金鱼血清GtH含量(+表示和注射前有显著差别; *表示和对照组有显著差别)。GSI = 性成熟系数; PS = 生理盐水。

Fig. 2 Serum gonadotropin levels of goldfish following two injections of LRH-A 12 hours apart just prior to the spawning season in early spring (February). (+significant differences from presample, * significant differences from PS injections)

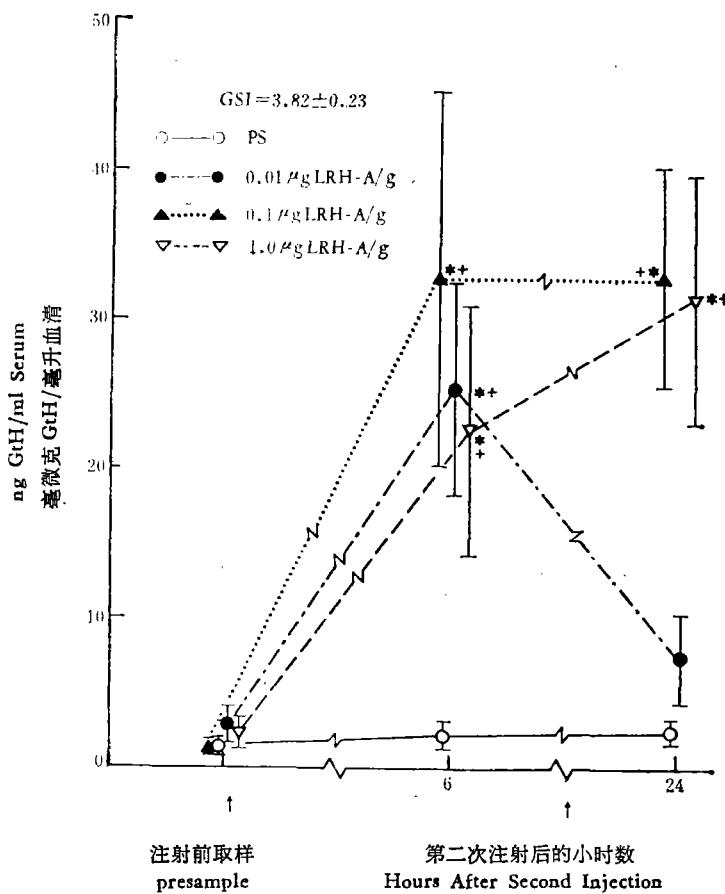


图 3 5月到6月生殖季节过后，12 小时间隔两次注射 LRH-A 后(即试验的第一组)，雄金鱼血清 GtH 含量(+表示和注射前有显著差别；*表示和对照组有显著差别)。

Fig. 3 Serum gonadotropin levels of goldfish following two injections of LRH-A 12 hours apart just after the spring spawning season (May-June). (+significant differences from presample, * significant differences from PS injections)

量 LRH-A 两次注射后 6 小时，血清 GtH 含量仅 22—33 毫微克/毫升，而且在注射 24 小时后没有明显增高(图 3)。

在 8 月，金鱼性腺处于退化状况，对 LRH-A 的 GtH 释放反应微弱，甚至没有反应。如在第一组(图 4)，低剂量和高剂量注射后，血清 GtH 含量没有增高，仅中剂量注射后血清 GtH 含量增到 20—22 毫微克/毫升；而在第三组(图 5)，注射 LRH-A 后，血清 GtH 含量没有变化。

2. 注射剂量对 LRH-A 反应的影响

注射剂量的高低对血清 GtH 含量增高的影响并不都是很明显，但常见的情况是：低剂量和中剂量诱导血清 GtH 含量增高的幅度比较相近，但含量增高的持续性常不能达到 24 小时就降低；高剂量诱导的血清 GtH 含量通常是最高的，并且能维持达 24 小时之久，如雄金鱼在 2 月份第二组的测定结果所示(图 6)。

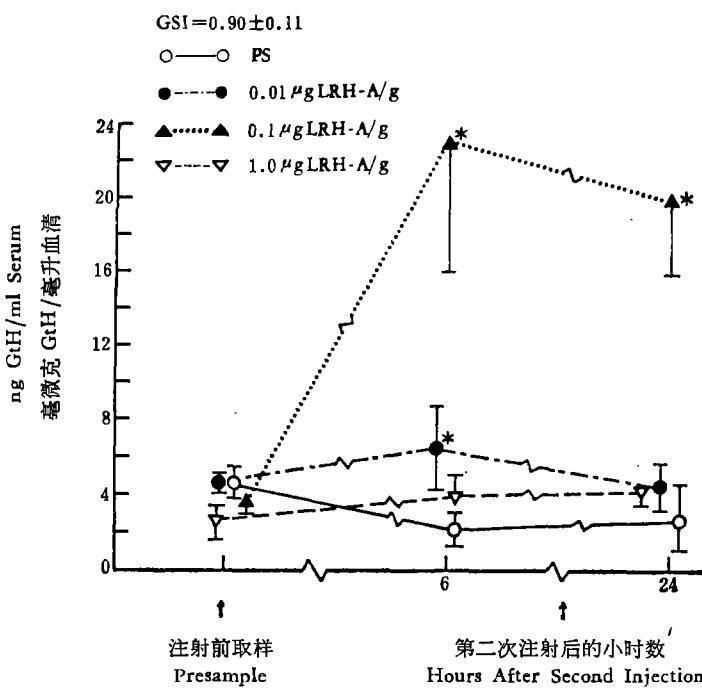


图4 8月雄金鱼性腺处于退化状况,12小时间隔两次注射LRH-A后(即试验的第一组),血清GtH含量(*表示和对照组有显著差别)。

Fig. 4 Serum gonadotropin levels of goldfish following two injections of LRH-A 12 hours apart in the summer (August) when the fishes were sexually regressed. (*significant differences from PS injections)

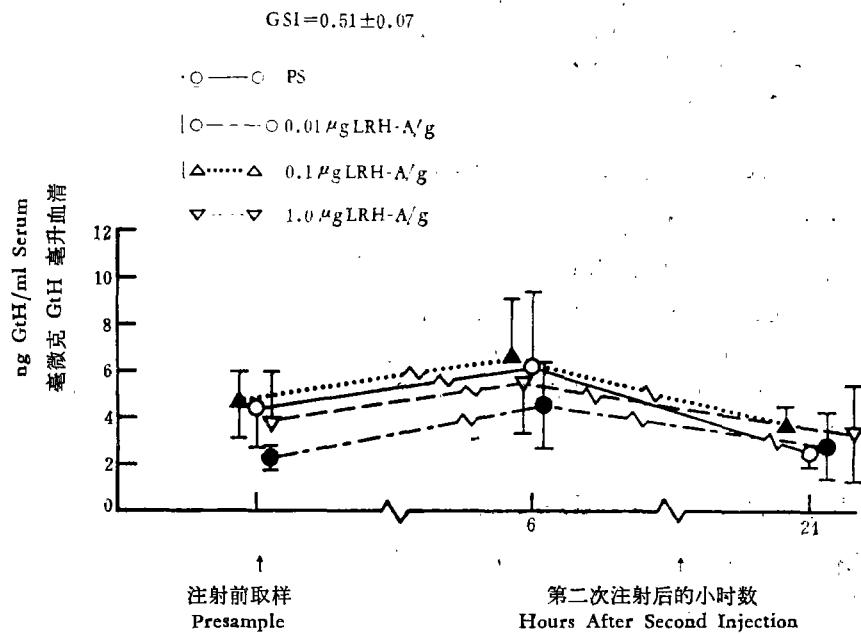


图5 8月雄金鱼性腺处于退化状况,12小时间隔两次注射LRH-A,重复进行3次之后(即试验的第三组)血清GtH含量。

Fig. 5 Serum gonadotropin levels of goldfish following two injections of LRH-A 12 hours apart given three times in the summer (August) when the fishes were sexually regressed

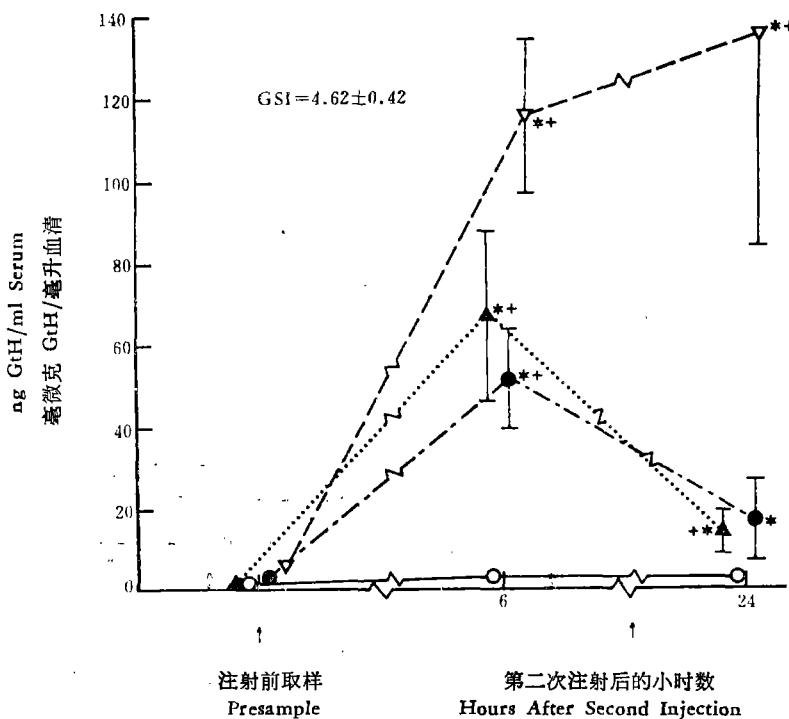


图6 早春(2月)生殖季节刚要开始前,12小时间隔两次注射LRH-A,重复进行2次之后(即试验的第二组),雄金鱼血清GtH含量(+表示和注射前有显著差别,*表示和对照有显著差别)。

Fig. 6 Serum gonadotropin levels of goldfish following two injections of LRH-A 12 hours apart given twice just prior to the spawning season in early spring (February). (+ significant differences from presample, * significant differences from PS injections. O—O PS, ---● 0.01 ug LRH-A/g, ▲---▲ 0.1 ug LRH-A/g, ▽---▽ 1.0 ug LRH-A/g)

3. 注射LRH-A后脑垂体GtH含量的变化

在雄金鱼5—6月和11月的两次试验都测定了脑垂体GtH含量,其结果(图7,8)表明:第一组和第二组的脑垂体GtH含量在注射不同剂量LRH-A后没有发生明显变化;但在第三组,两次注射中剂量和高剂量共重复进行3次之后,脑垂体GtH含量明显降低。由此可见,用适宜的LRH-A剂量、注射次数和注射时间间隔进行注射,脑垂体的GtH含量能保持正常状况;但如果以高剂量多次的重复注射以诱导GtH释放后,脑垂体的GtH含量就会明显降低。

4. 温度和注射时间间隔对LRH-A反应的影响

比较了不同温度(12—14°C和20°C)和不同的两次注射时间间隔(3小时和9小时)对LRH-A反应的影响(图9,10)。

在20°C,卵巢正在发育成熟的金鱼,两次注射低剂量和中剂量后5小时,取血样测定,两次注射间隔时间为3小时的一组,其血清GtH含量明显较间隔时间为9小时的高;但在注射后16小时取的血样,两组的血清GtH含量则十分相近。

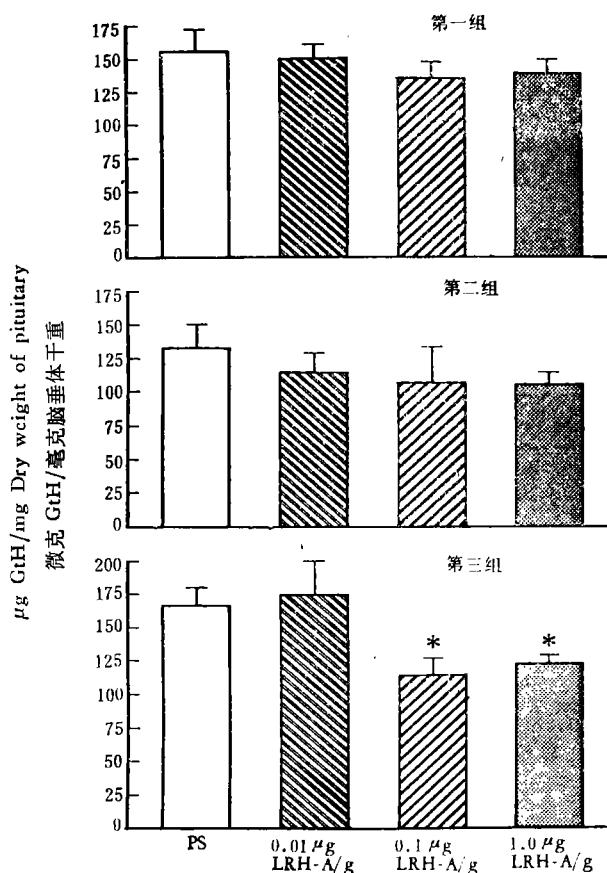


图7 5月到6月生殖季节过后，12小时间隔两次注射LRH-A，重复进行3次之后雄金鱼脑垂体的GtH含量（*表示和对照组有显著差别）。

Fig. 7 Pituitary gonadotropin levels of goldfish following two injections of LRH-A 12 hours apart given three times just after the spring spawning season (May-June). (*significant differences from PS injections)

在12—14℃，以3小时间隔两次注射低剂量后5小时和16小时取血样测定，其血清GtH含量都较间隔时间为9小时的高；但两次注射中剂量，则3小时和9小时的不同时间间隔对血清GtH含量没有影响。

还可以看到，以较短的3小时间隔进行LRH-A两次注射，在12—14℃的，血清GtH含量增高的持续时间（16小时以上）要比在20℃（不足16小时）长。而以较长的9小时间隔进行LRH-A两次注射，不同的温度对血清GtH含量增高的持续性没有明显影响。

从这些结果可以看到，在温度、LRH-A注射剂量或两次注射间隔时间和诱导的血清GtH含量之间不是简单的直接依赖关系，而是这几个因素互相影响和制约的。无论在较高的或较低的温度下，以较短的时间间隔进行LRH-A两次注射，都能诱导血清GtH含量迅速而明显的增高。但在较低温度下，GtH含量增高的持续性要比在较高温度时长些。如果两次注射的间隔较短，则低剂量在较低温度下能比高剂量诱导出较强的反应；而如果两次注射的间隔时间较长，则高剂量能诱导比较明显的反应。

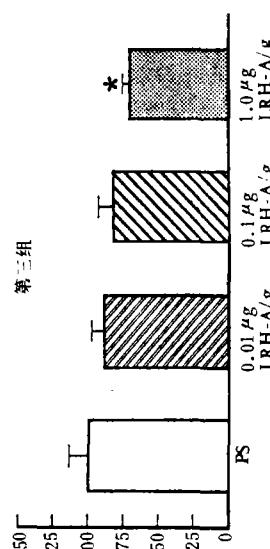
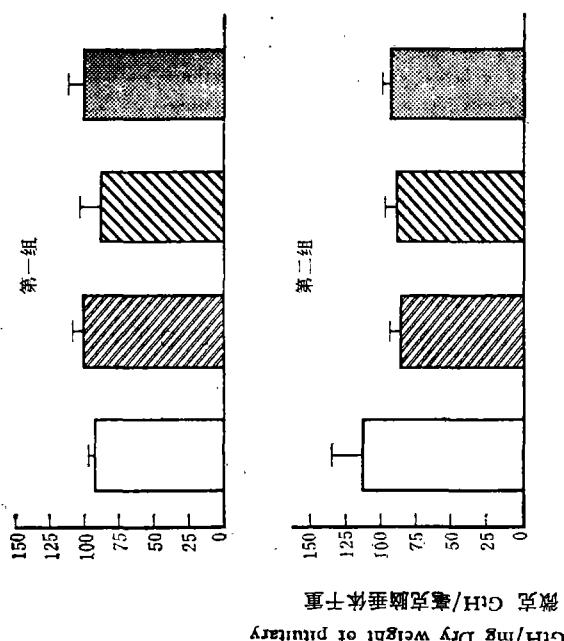


Fig. 8 Pituitary gonadotropin levels of goldfish following two injections of LRH-A 12 hours apart given three times in the autumn (November) when the fishes were sexually regressed. (*) significant differences from PS injections.

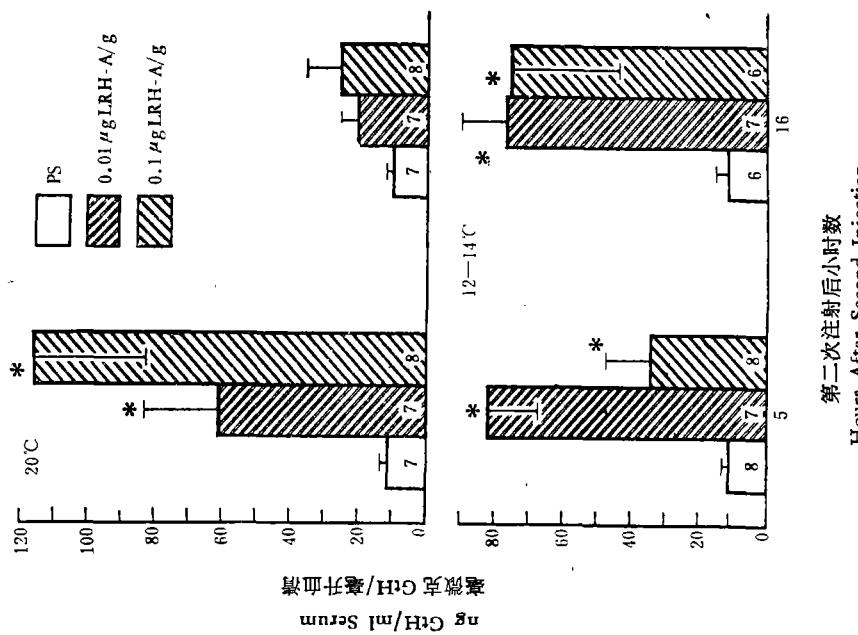


Fig. 9 Serum gonadotropin levels of female goldfish following two injections of LRH-A 3 hours apart held at 12—14°C and 20°C. (*) significant differences from PS injections.

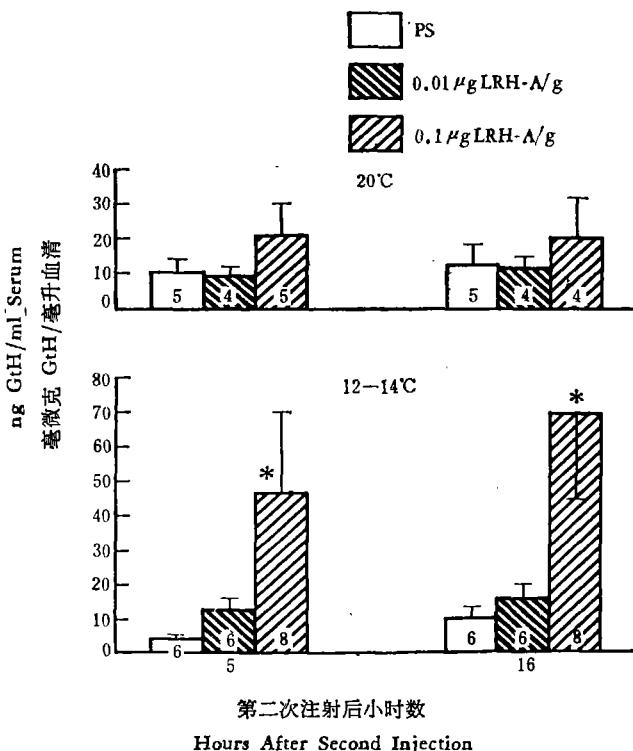


图 10 雌金鱼在 12—14°C (下) 和 20°C (上), 9 小时间隔两次注射 LRH-A 后血清 GtH 含量 (* 表示和对照组有显著差别)。

Fig. 10 Serum gonadotropin levels of female goldfish following two injections of LRH-A 9 hours apart held at 12—14°C and 20°C. (* significant differences from PS injections)

5. 每日注射 LRH-A 的反应

8月份用卵巢处于退化状况的雌金鱼做的试验结果(图11)表明: LRH-A 连续 10 天注射后 6 小时取血样, 低剂量和高剂量都能诱导血清 GtH 含量增高到 60—80 毫微克/毫升; 与此同时, 雌金鱼的性成熟系数比对照组高, 尤其是高剂量诱导雌鱼卵巢明显增大。各试验组脑垂体的 GtH 含量也比对照组有所增高。2月份用卵巢正在发育成熟的雌金鱼做的试验结果(图12)表明: 经过 9 天连续注射 LRH-A, 低剂量和高剂量所诱导的血清 GtH 含量均增高不多, 仅 20 毫微克/毫升左右; 而高剂量组的性成熟系数明显降低, 脑垂体的 GtH 含量亦减少。

这些结果表明: 连续 9—10 天每日注射 LRH-A 能刺激性腺已经退化的金鱼恢复性腺发育, 表现为血液中保持较高的 GtH 含量和性成熟系数增大; 但对性腺正在发育的金鱼, 多次注射高剂量却抑制或减慢其性腺的进一步发育, 表现为血清 GtH 含量增高不明显和性成熟系数减小。

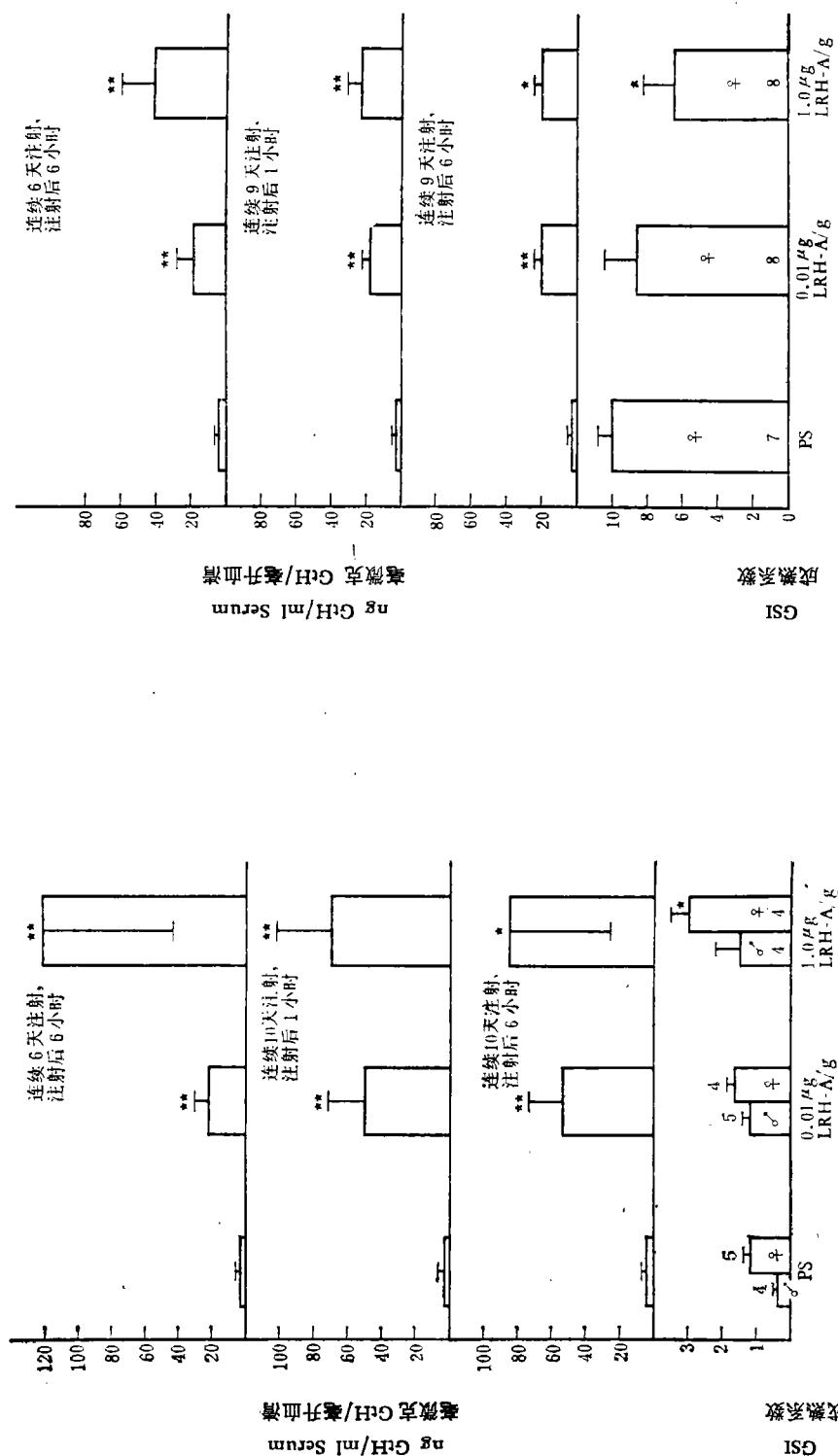


图 11 8月金鱼性腺处于退化状态, 每日注射 LRH-A, 连续 10 天后, 血清 GtH 含量和性腺成熟系数 (GSI) (*示和对照组有显著差别)。

Fig. 11 Serum gonadotropin levels and GSI of sexually regressed goldfish following daily injection of LRH-A for up to 10 days in the summer (August). (*significant differences from PS injections)

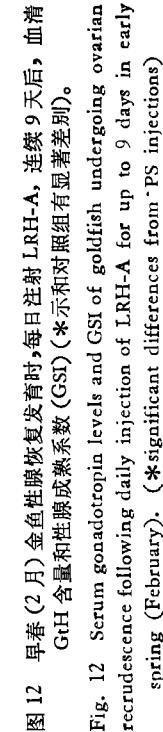


图 12 早春(2月)金鱼性腺恢复发育时, 每日注射 LRH-A, 连续 9 天后, 血清 GtH 含量和性腺成熟系数 (GSI) (*示和对照组有显著差别)。

Fig. 12 Serum gonadotropin levels and GSI of goldfish undergoing ovarian recrudescence following daily injection of LRH-A for up to 9 days in early spring (February). (*significant differences from PS injections)

讨 论

LRH-A 已在我国广泛应用于鱼类的人工繁殖，国外也在开始试验和应用。关于不同季节、温度、剂量、注射次数和注射间隔时间等对鱼类注射 LRH-A 后 GtH 释放反应的影响情况，是在鱼类人工繁殖中使用 LRH-A 所普遍关心和感兴趣的问题。本文的研究结果，可为生产实际提供有用的参考资料。但是，还有许多问题，例如是什么因素促成金鱼对 LRH-A 反应的季节性变化？其作用机理如何？要诱导持续的血液 GtH 高含量，最有效的温度，剂量，注射间隔时间等是什么？LRH-A 长时间每日注射，能促进性腺已经退化的金鱼恢复性腺发育，而对性腺正在发育的金鱼，则抑制或减慢其性腺进一步发育，其作用机理是什么？是否由于注射过多 LRH-A 改变或破坏了体内正常的 GtH 分泌状况，从而影响性腺发育，或者过多的 LRH-A 对性腺已开始发育的鱼类有某种直接不良影响等等，目前还不清楚，有待进一步研究解决。

参 考 文 献

- [1] 经济鱼类激素应用研究协作组，1976。一种新的高效能的鱼类催产剂——促黄体生成素释放激素类似物的应用。中国科学，(4): 388。
- [2] 福建、江苏、浙江、上海淡水经济鱼类人工繁殖协作组，1977。合成促黄体生成素释放激素的类似物 (LRH-A) 对家鱼催产效果的进一步探讨。生物化学与生物物理学报，(9): 15—24。
- [3] Breton, B. and C. Weil, 1973. Effets du LH/FSH-RH synthétique et d'extraits hypothalamiques de Carpe sur la sécrétion d'hormone gonadotrope in vivo chez la carpe (*Cyprinus carpio L.*). *C. R. Acad. Sci. (Ser. D.)*, 277: 2061—2064.
- [4] Crim, L. W. and D. M. Cluett., 1974. Elevation of plasma gonadotropin concentration in response to mammalian gonadotropin releasing hormone (GnRH) treatment of the male brown trout as determined by radio-immunoassay. *Endocrinol. Res. Commun.*, 1: 101—110.
- [5] Crim, L. W., R. E. Peter and R. Billard., 1976. Stimulation of gonadotropin secretion by intraventricular injection of hypothalamic extracts in the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 30: 77—82.
- [6] Greenwood, F. C., W. M. Hunter and J. Glover, 1963. The preparation of ^{131}I -labelled human growth hormone of high specific activity. *Biochem. J.*, 89: 114—123.
- [7] King, J. A. and R. P. Millar, 1980. Comparative aspects of luteinizing hormone-releasing hormone structure and function in vertebrate phylogeny. *Endocrinology*, 106: 707—717.
- [8] Ng, T. Bun and D. R. Idler., 1978. "Big" and "little" forms of plaice vitellogenetic and maturation hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 34: 408—420.
- [9] Ng, T. Bun and D. R. Idler., 1978. A vitellogenetic hormone with a large and a small form from salmon pituitaries. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 35: 189—195.
- [10] Peter, R. E., 1980. Serum gonadotropin levels in mature male goldfish in response to luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH and des-Gly¹⁰-(D-Ala⁶)-LH-RH ethylamide. *Can. J. Zool.*, 58: 1100—1104.
- [11] Peter, R. E., 1982. Neuroendocrine control of reproduction in teleosts. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39: 48—55.
- [12] Peter, R. E. and L. W. Crim, 1979. Reproductive endocrinology of fishes: gonadal cycles and gonadotropin. *Ann. Rev. Physiol.*, 41: 323—335.
- [13] Weil, C., Breton, B., Reinaud, P. and B. Reinaud, 1975. Etude de la réponse hypophysaire à l'ad-

ministration de Gn-RH exogene au cours du cycle reproducteur annuel chez la carpe *Cyprinus carpio* L. C. R. Acad. Sci. (Ser. D.), 280: 2469—2472.

ACTIONS OF THE SUPERACTIVE ANALOGUE DES- GLY¹⁰ (D-ALA⁶) LRH ETHYLAMIDE (LRH-A) ON GONADOTROPIN SECRETION IN GOLDFISH (*CARASSIUS AURATUS*)

Lin Haoren

(Department of Biology, Zhongshan (Sun Yatsen) University, Guangzhou)

Richard E. Peter, Carol S. Nahorniak and Odd Bres

(Department of Zoology, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada)

Abstract

The effects of season, temperature, dosage, frequency of injection and interval between injections on the GtH release-response to LRH-A in goldfish were investigated. The results demonstrated that goldfish have a very dramatic seasonal variation in responsiveness to LRH-A. The highest serum GtH levels induced were just prior to the spawning season in early spring (February.) Following the spring spawning season (May-June), the GtH release-response was less, and, in the summer (August) when the fish were sexually regressed, there was little or no response. A dose dependence was not always clear in the response, but high dose (1.0 ug/g body weight) usually induced the highest levels and had a persistent effect for 24 hours. The pituitary GtH level was significantly lower after a series of injections of high dose. There is a close relationship between the level of serum GtH induced, and temperature, the dosage of LRH-A injected, the interval between injections. Daily injections of LRH-A for up to 9—10 days can stimulate onset of gonadal recrudescence in sexually regressed goldfish; however, it may slow down or block gonadal recrudescence in goldfish that have commenced development.