

# 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)<sup>[1,12]</sup>。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<sup>[7]</sup>;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<sup>[3,4,10,13]</sup>。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<sup>[1,2]</sup>,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℃,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,每天随意投喂鲢鳙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-Gly<sup>10</sup>-(D-Ala<sup>6</sup>)-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定时间 (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 thiomersolate 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 <sup>125</sup>I 标志 (Greenwood 等)<sup>[6]</sup>。在交联葡聚糖 G-50 的 1 × 10 厘米柱上进行层析, 使 <sup>125</sup>I-c-GtH 和无机的 <sup>125</sup>I 分离。然后, 采用伴刀豆球蛋白 A-琼脂糖吸收法将 <sup>125</sup>I-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- $\alpha$ -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<sup>[8,9]</sup> 所叙述的相当。放射免疫的测定, 系根据 Crim 等<sup>[5]</sup> 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

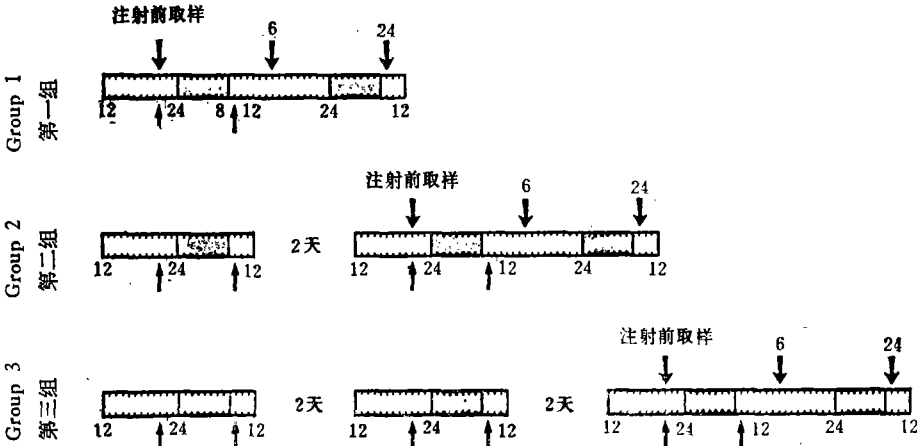


图 1 测定金鱼对 LRH-A 的 GtH 释放反应的试验安排(图中数字表示时间,小箭头表示注射时间,大箭头表示取样时间)

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

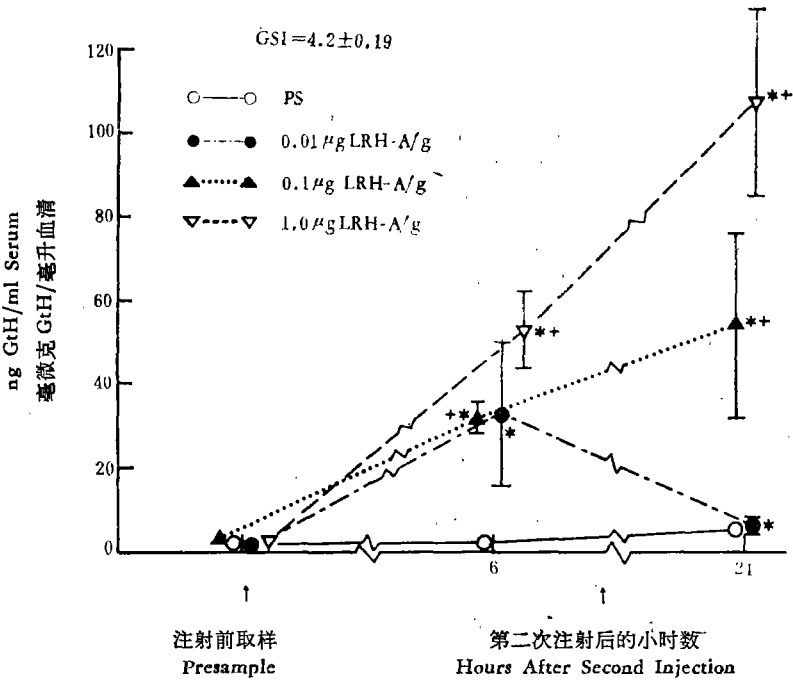


图 2 早春(2月)生殖季节刚要开始前,12小时间隔两次注射 LRH-A 后(即试验的第一组),雄金鱼血清 GtH 含量(+表示和注射前有显著差别;\*表示和对照组有显著差别)。GSI = 性成熟系数;PS = 生理盐水。  
Fig. 2 Serum gonadotropin levels of goldfish following two injections of LRH-A 12 hours apart just prior to the spawning season in early spring (February). (+significant differences from presample, \* significant differences from PS injections)

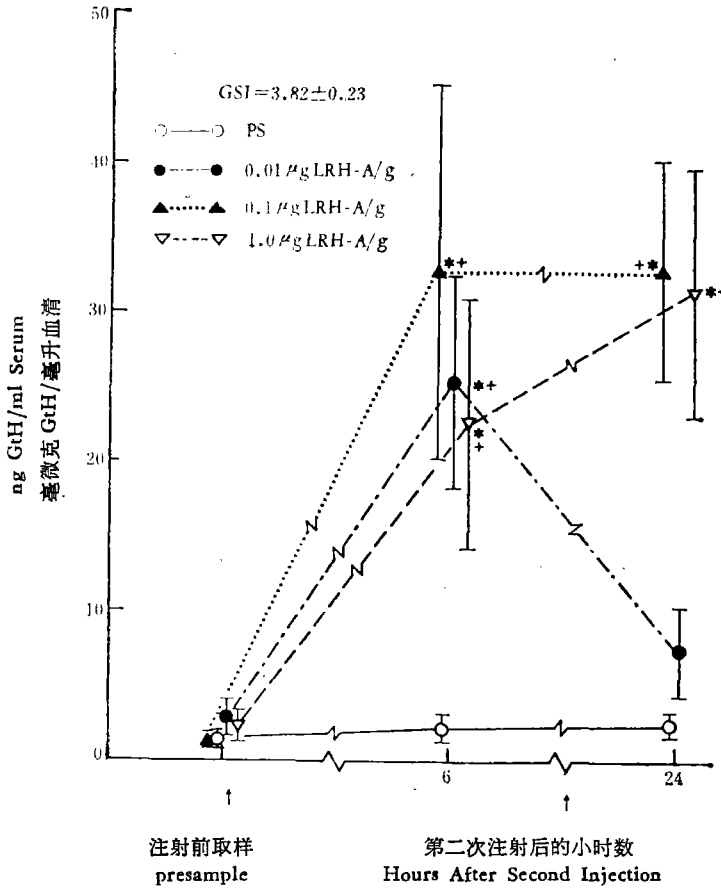


图 3 5 月到 6 月生殖季节过后, 12 小时间隔两次注射 LRH-A 后(即试验的第一组), 雄金鱼血清 GtH 含量(+表示和注射前有显著差别;\*表示和对照组有显著差别)。

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)。

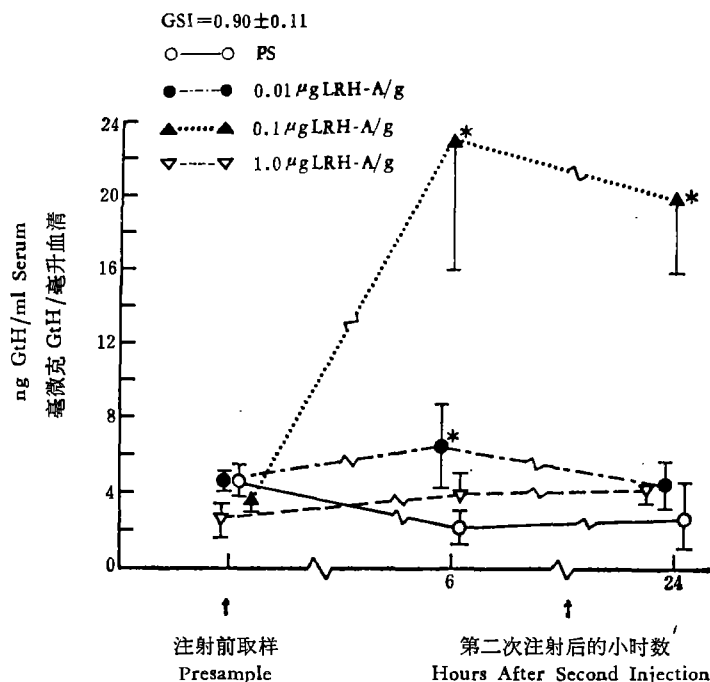


图 4 8 月雄金鱼性腺处于退化状况, 12 小时间隔两次注射 LRH-A 后(即试验的第一组), 血清 GtH 含量(\*表示和对照组有显著差别)。

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)

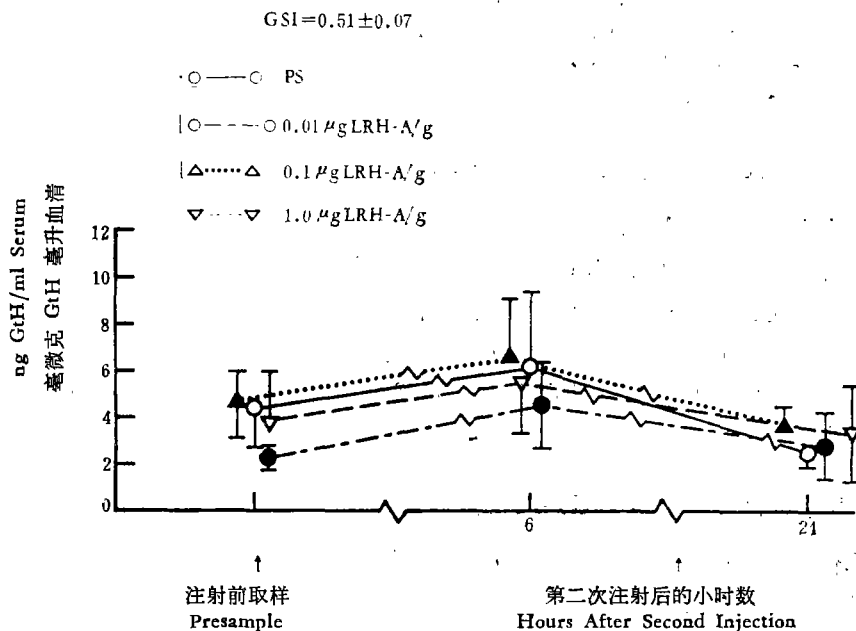


图 5 8 月雄金鱼性腺处于退化状况, 12 小时间隔两次注射 LRH-A, 重复进行 3 次之后(即试验的第三组)血清 GtH 含量。

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

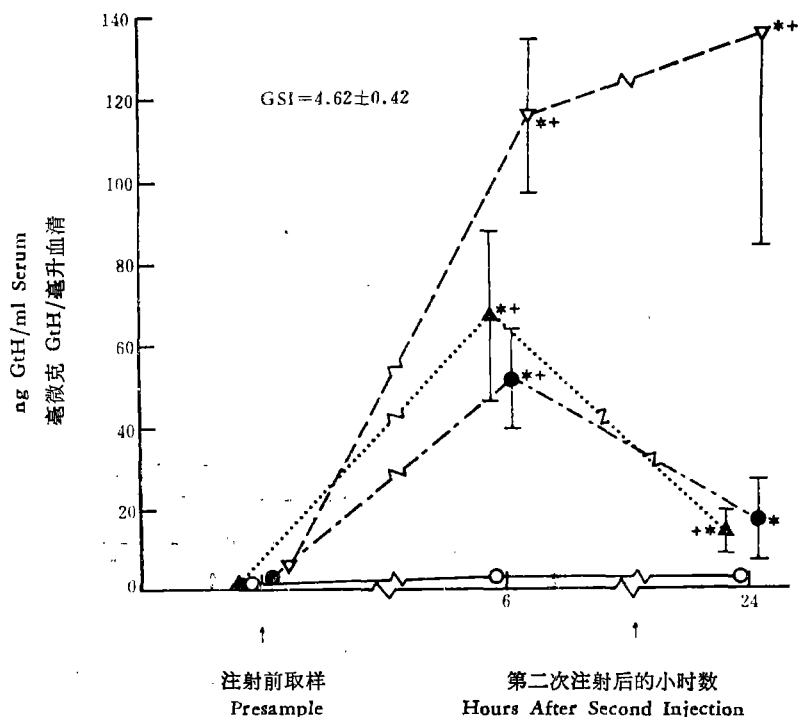


图6 早春(2月)生殖季节刚要开始前,12小时间隔两次注射 LRH-A,重复进行2次之后(即试验的第二组),雄金鱼血清 GtH 含量(+表示和注射前有显著差别,\*表示和对照有显著差别)。

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℃ 和 20℃)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℃,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。

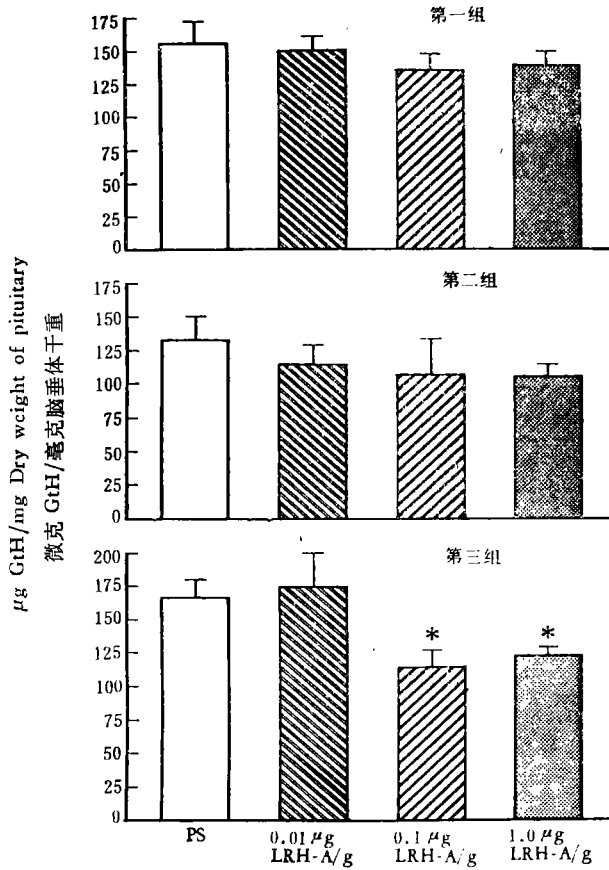


图 7 5月到6月生殖季节过后, 12小时间隔两次注射 LRH-A, 重复进行3次之后雄金鱼脑垂体的 GtH 含量(\*表示和对照组有显著差别)。

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。

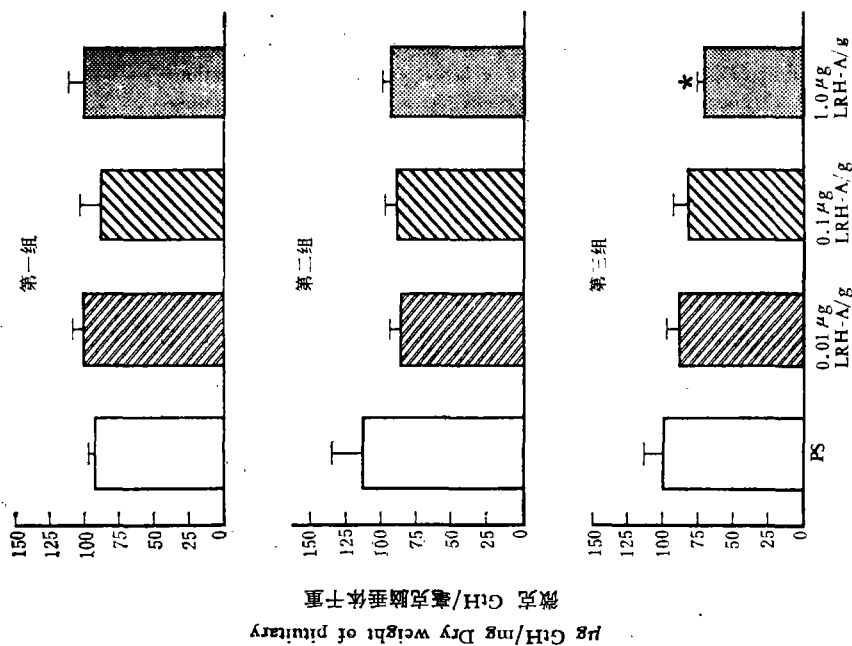
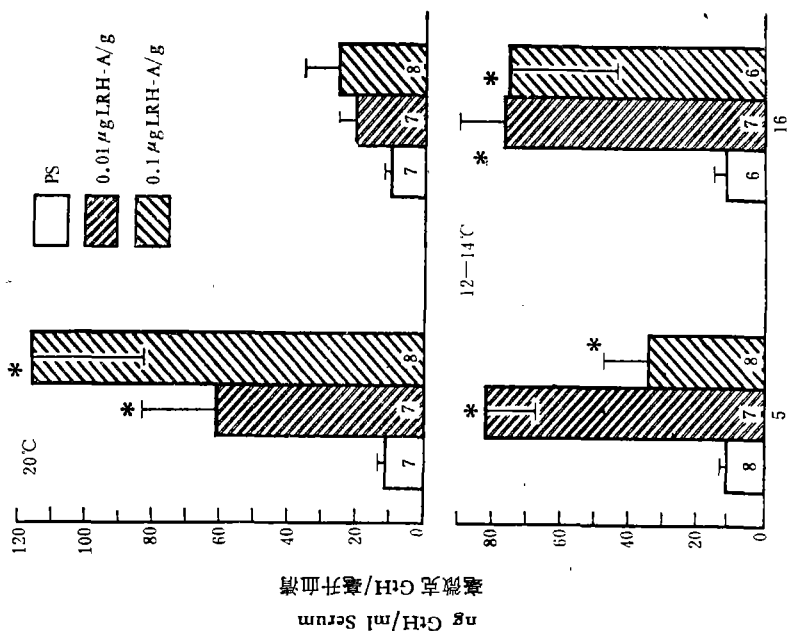


图8 11月雄金鱼性腺处于退化状况, 12小时间隔两次注射 LRH-A, 重复进行3次之后脑垂体的 GtH 含量(\*表示和对照组有显著差别)。  
Fig. 8 Pituitary gonadotropin levels of goldfish following two injections of LRH-A 12 hours apart given three times in the autumn (November) when the fishes were sexually regressed. (\*significant differences from PS injections)



第二次注射后小时数

Hours After Second Injection

图9 雌金鱼在 12-14°C (下) 和 20°C (上), 3 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. 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)



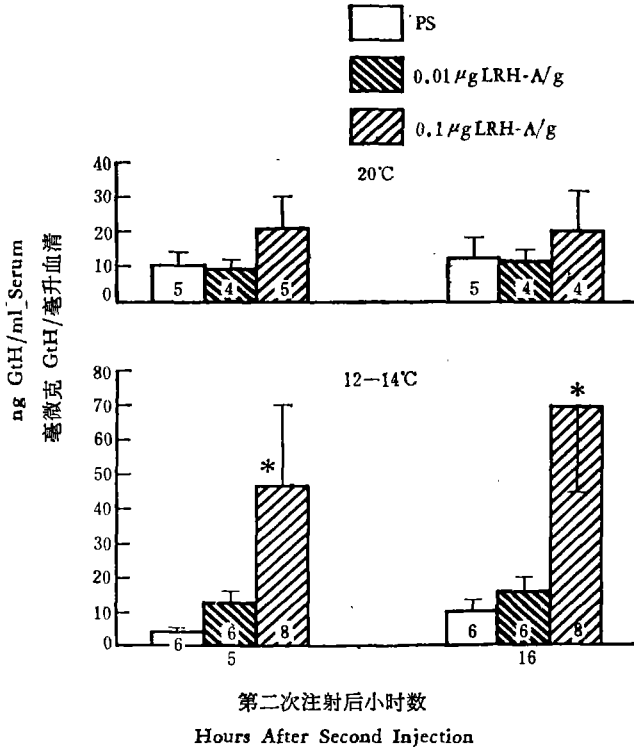


图 10 雌金鱼在 12—14°C (下) 和 20°C (上), 9 小时间隔两次注射 LRH-A 后血清 GtH 含量 (\*表示和对照组有显著差别)。

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。

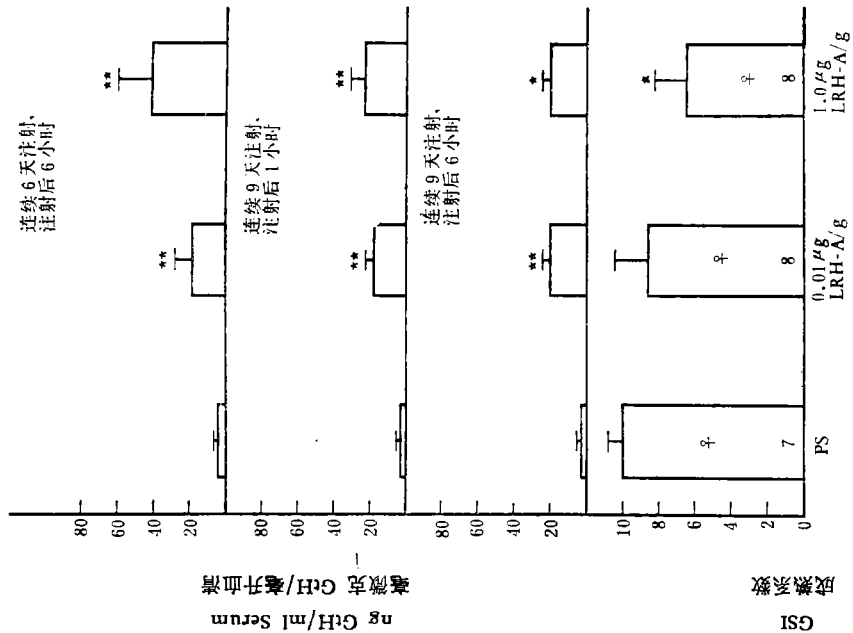


图 12 早春 (2 月) 金鱼性腺恢复发育时, 每日注射 LRH-A, 连续 9 天后, 血清 GtH 含量和性腺成熟系数 (GSI) (\*示和对照组有显著差别)。

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)

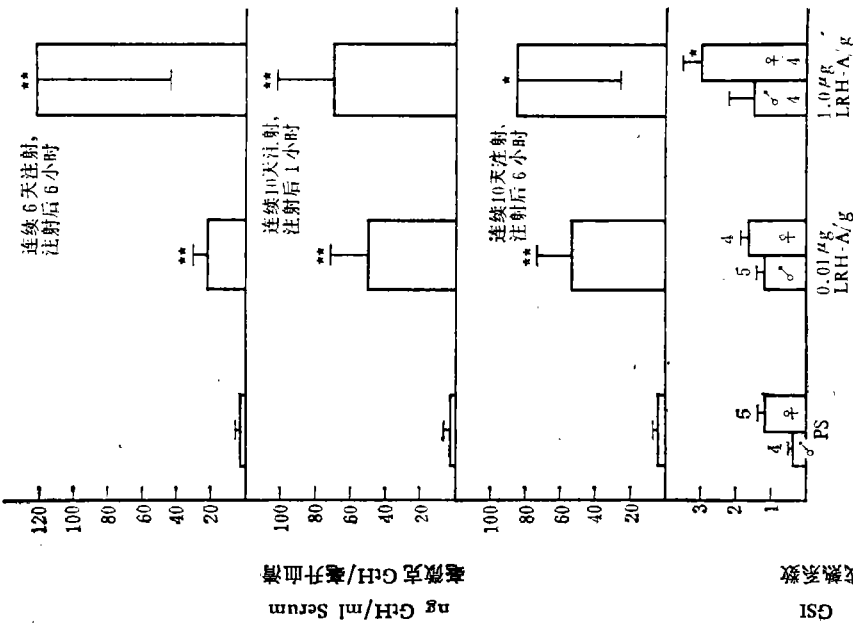


图 11 8 月金鱼性腺处于退化状况, 每日注射 LRH-A, 连续 10 天后, 血清 GtH 含量和性腺成熟系数 (GSI) (\*示和对照组有显著差别)。

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)

## 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 <sup>131</sup>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 vitellogenic and maturational hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 34: 408—420.
- [9] Ng, T. Bun and D. R. Idler., 1978. A vitellogenic 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-Gly<sup>10</sup>-(D-Ala<sup>6</sup>)-LH-RH ethylamide. *Can. J. Zool.*, 58: 1100—1104.
- [11] Peter, R. E., 1982. Neuroendocrine control of reproduction in teleosts. *Can. J. Fish. Aqua. 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-GLY<sup>10</sup> (D-ALA<sup>6</sup>) 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.