

文章编号: 1000-0615(2000)05-0407-05

雄烯二酮和甲基睾酮诱导 雌性日本鳗鲡性腺发育的反馈调节作用

张利红, 张为民, 林浩然
(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要: 采用间隔 15d 多次埋植雄激素雄烯二酮(4-androstene-3, 17-dione, ADSD) 或甲基睾酮(17 α -methyl-testosterone, MT) 诱导雌性日本鳗鲡(*Anguilla japonica*) 性腺发育成熟; 并着重研究埋植雄激素后, 雌鳗血清中促性腺激素(GtH) 及脑和垂体中哺乳类促性腺激素释放激素(mGnRH) 含量的动态变化。一次或多次埋植 ADSD 后, 1~5d 的血清 GtH 含量上升, 然后下降; 并且, 血清 GtH 含量上升的幅度随埋植次数的增加而增加; 对于 MT 处理组, 只在埋植 7 次后第 15 天测得血清 GtH 水平显著高于对照组, 但仍显著低于 ADSD 处理组。这表明埋植 ADSD 和 MT 可促进 GtH 的分泌, 但两者促进 GtH 分泌的作用存在显著差异。埋植 ADSD 1d 后, 脑和垂体中 mGnRH 含量明显增加, 第 2 天后和对照组无明显差别, 表明 ADSD 促进了 mGnRH 的合成, 并可能有一定程度的释放。研究表明雄激素对性腺未发育成熟的雌性日本鳗鲡在脑和垂体两个水平存在正反馈调节作用。

关键词: 日本鳗鲡; 性腺发育; 雄性激素; 反馈调节
中图分类号: S917 **文献标识码:** A

The feedback effects of 4-androstene-3, 17-dione and 17 α -methyl-testosterone on gonadal development in the female *Anguilla japonica*

ZHANG Li-hong, ZHANG Wei-min, LIN Hao-ran
(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The effects of 4-androstene-3, 17-dione (ADSD) and 17 α -methyl-testosterone (MT) via implantation on maturation of the female silver eel, *Anguilla japonica* and their kinetic effects on serum GtH levels, brain and pituitary GnRH levels were studied. Serum GtH levels increased during the period of 1-5 days after implantation of ADSD, and the responses elevated with increasing times of implantation of ADSD. Implantation of MT, however, did not increase serum GtH levels significantly, except on the 15th day after 7 times of implantation. These results indicated that implantation of ADSD and MT stimulated the secretion of GtH, and there was a difference in effect between ADSD and MT. A single ADSD implantation significantly increased mGnRH contents in the brain and pituitary one day after treatment, but two days later, mGnRH contents in the brain and pituitary returned to the levels of the controls, indicating that implantation of ADSD stimulated the mGnRH synthesis and secretion. Thus, androgen have positive feedback effects at the brain and pituitary level to stimulate gonadal development in the female silver eel.

收稿日期: 1999-11-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 39790101 号和 1996 年度高校博士点专项科研资金

作者简介: 张利红(1968-), 女, 陕西人, 博士, 助理研究员, 主要从事动物生理学研究。Tel: 020-84110828, E-mail: ls65@zsu.edu.cn

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Key words: *Anguilla japonica*; gonadal development; androgen; feedback effect

鳗鲡繁殖生物学的研究表明,鳗鲡和其他硬骨鱼一样,性腺发育是脑垂体合成和分泌的GtH作用的结果;GtH的功能受下丘脑合成和分泌的GnRH和促性腺激素释放的抑制因子的双重神经内分泌调节;而且,性类固醇激素雌二醇、睾酮、MT、ADSD对性未成熟鳗鲡的性腺发育存在反馈调节作用^[1-8]。在欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)中,仅有雌激素可提高脑部和垂体中mGnRH含量,并促进垂体中GtH的合成和分泌^[4,6,9]。在日本鳗鲡中,长期多次埋植雄激素ADSD和MT较雌激素雌二醇有更好的促性腺发育作用,可促进垂体GtH的合成和分泌^[2,8]。但是,埋植ADSD或MT诱导雌鳗性腺发育过程中,日本鳗鲡脑和垂体中的GnRH水平及血清中的GtH水平的动态变化还未见报道。埋植的给药方法已广泛应用到人工诱导动物性腺发育成熟的研究中,它操作简单,作用持久,效果稳定,是一种有发展前景的给药方法。本文采用埋植雄烯二酮和甲基睾酮的方法,比较这两种雄激素的促性腺发育作用,并通过测定脑和垂体中GnRH水平及血清中GtH水平的动态变化,来进一步探讨性类固醇激素在日本鳗鲡脑和垂体水平的作用机理。

1 材料与方 法

每年10-12月从广东省番禺市附近的珠江口选购体质优良、体重为320~460g的雌性下海日本鳗鲡作为实验材料,蓄养在室内人工海水循环系统中。人工海水采用中国科学院南海海洋研究所研制的水晶配制而成,盐度为30~34,自然光照,实验期间水温变化范围是15~26℃。

甲基睾酮和雄烯二酮为美国Sigma公司产品,和硅塑料混合后制成长条,以 $50\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 体重的剂量,间隔15d埋植在鳗鱼腹腔内,对照组埋植不含激素的硅塑料条。从尾静脉取血,血样在4℃静置2h后离心分离血清,存放在-20℃以备GtH测定。实验结束时解剖鱼体,称量体重和性腺重,计算性腺成熟系数GSI,取全脑(包括嗅球,端脑,间脑,中脑,后脑和延髓)和脑垂体存放在-20℃以备测量mGnRH。脑和垂体mGnRH的抽提参照Yu等^[10]的方法稍加修改,组织在1mL冰冻的2N乙酸中用超声波匀浆,在4℃以15000g离心20min,收集上清液冰冻干燥,重新溶解在磷酸缓冲液中。mGnRH测定参照Dufour等^[6]建立的欧洲鳗鲡GnRH的测定方法,以mGnRH为标准品和标记抗原,用氯氨T法对mGnRH进行^I¹²⁵标记。mGnRH抗体由南非开普顿大学King博士惠赠,与鲑鱼GnRH,鸡类GnRH II的免疫交叉反应小于0.4%。GtH含量的测定采用本实验室建立的GtH放射免疫测定法^[1]。

2 结果

2.1 埋植ADSD和MT对雌性鳗鲡性腺发育的作用

如图1所示,间隔15d多次单独埋植ADSD或MT明显促进雌鳗性腺发育。埋植ADSD 8次的雌鳗GSI为 $(29.08\pm 5.30)\%$,埋植ADSD 9次的GSI达 $(39.75\pm 6.13)\%$,极显著高于对照组,性腺发育最好的个体GSI达53.59%;在实验结束时,60%的个体GSI可超过40%。埋植MT 8次,雌鳗GSI是 $(27.20\pm 8.34)\%$,性腺发育最好的个体GSI达42.45%,和埋植ADSD 8次时的GSI相近,但是埋植MT 6次后,雌鳗陆续死亡,仅有20%的个体GSI可超过40%。这些结果表明,这两种雄激素均可促进性腺发育成熟,但ADSD比MT副作用小,效果稳定,是一种更有发展前景的催熟药物。

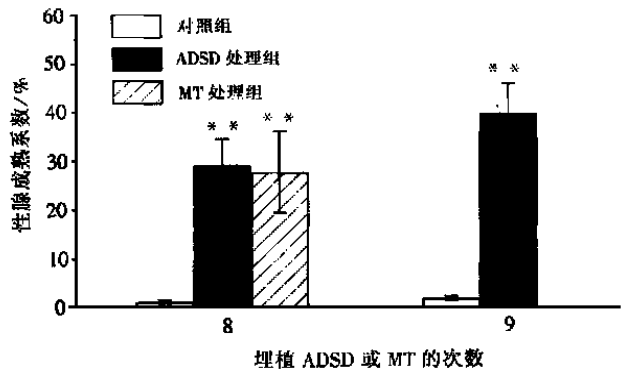


图1 埋植ADSD或MT对雌鳗GSI的影响

Fig. 1 Effects of implantation of ADSD or MT on GSI in female *A. japonica*

各值表示为平均值±标准差(n=6)

** 显著高于对照组(P<0.01)

2.2 埋植 ADSD 或 MT 后雌性鳗鲡血清 GtH 水平的动态变化

图 2 显示埋植 ADSD 或 MT 后血清 GtH 含量的动态变化。第 1 次埋植 ADSD 后 1~5d 血清 GtH 水平有微弱上升, 但对对照组无显著差别(图 2A); 第 5 次埋植 ADSD 后第 1、3 天血清 GtH 水平显著高于对照组和 MT 处理组, 然后降低到对照组水平(图 2B); 第 7 次埋植 ADSD 后 1~15d 血清 GtH 水平一直显著高于对照组和 MT 处理组(图 2C)。而第 1、5 次埋植 MT 后血清 GtH 水平和对照组无显著差别(图 2A, 2B), 仅第 7 次埋植 MT 后第 15 天血清 GtH 水平显著高于对照组(图 2C); 表明埋植 ADSD 和 MT 可促进 GtH 的分泌, 但两者促进 GtH 分泌的作用存在显著差异。

2.3 埋植 ADSD 对 mGnRH 合成和分泌的影响

如图 3 所示, 埋植 ADSD 后第 1 天, 脑和垂体 mGnRH 含量显著高于对照组, 表明埋植 ADSD 1d 后, 脑内 mGnRH 合成已显著增加; 埋植 ADSD 后第 2 天的脑和垂体 mGnRH 含量与对照组无明显差别。

3 讨论

本文采用多次埋植 ADSD 或 MT 的方法诱导雌性日本鳗鲡性腺发育成熟, 表明雄激素 ADSD 和 MT 对性未发育成熟的雌鳗性腺发育有明显的促进作用。但是, MT 处理的雌鳗死亡率高, 这可能是由于 MT 对鱼体内许多组织和器官均有生理作用, 从而严重破坏了雌鳗体内的生理平衡造成的。ADSD 作为睾酮生物合成的前体, 可转变为睾酮, 进而芳香化为雌二醇。在日本鳗鲡中, 埋植 ADSD 后, 血清中睾酮水平显著升高^[8], 表明 ADSD 可能在日本鳗鲡体内转化为睾酮起作用。ADSD 能有效的促进雌鳗性腺发育成熟, 而且效果稳定, 副作用小。因此, ADSD 是一种更有发展前景的催产剂, 但它的最佳剂量和作用时间等还需进一步的研究探讨。

在鲑鳟鱼类, 雌激素和能够芳香化为雌激素的雄激素在性未发育成熟的鱼中起正反馈调节作用, 可促进垂体 GtH 的合成^[11]。对雌性欧洲鳗鲡注射雌二醇、雌二醇+睾酮或雌二醇+ADSD 可促进垂体 GtH 的合成, 并且垂体 GtH 的含量和雌二醇的注射剂量有正的剂量依存关系, 而单独的雄激素无此作用, 说明在性未发育成熟的雌性欧洲鳗鲡只有雌激素对其性腺发育起正反馈调节作用^[4,9]。在雌性日本鳗鲡, 林浩然等^[2]的研究表明注射和埋植雌二醇或睾酮对雌鳗 GtH 的合成和分泌以及卵巢发育都有明显的促进作用; 本研究中, 埋植雄激素 ADSD 或 MT 可明显提高血清 GtH 水平, 诱导雌性日本鳗鲡性腺发育成熟。这些结果表明: 在性未发育成熟的雌性日本鳗鲡, 雌激素和雄激素可通过正反馈调节作用促进其性腺发育。

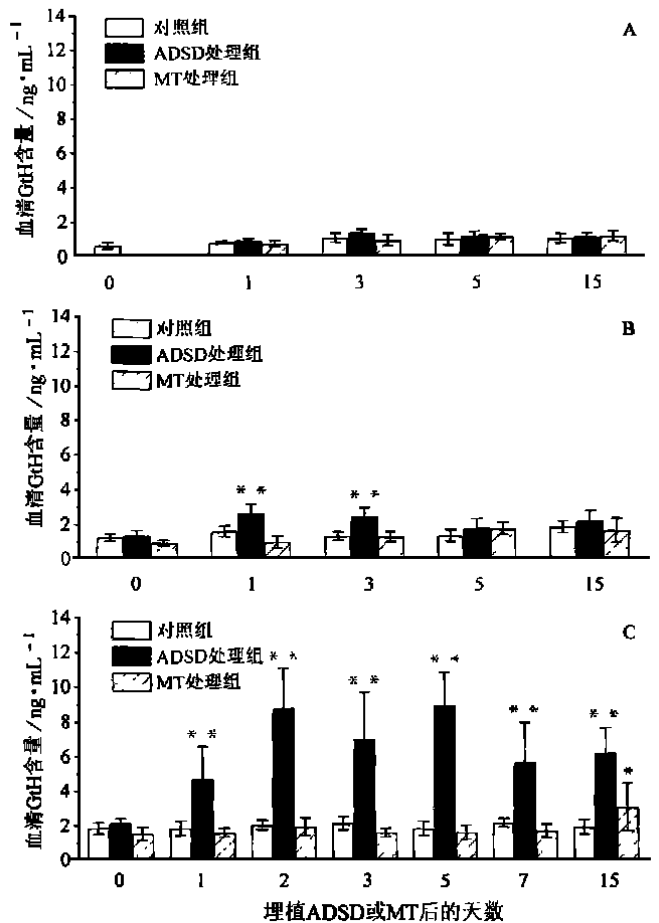


图 2 埋植 ADSD 或 MT 后血清 GtH 水平的动态变化

Fig. 2 Changes of serum GtH level after the implantation of ADSD or MT in female silver eel
A: 第 1 次埋植后; B: 第 5 次埋植后; C: 第 7 次埋植后
各值表示为平均值±标准差 (n=6)

* 显著高于对照组 (P < 0.05)

** 显著高于对照组和 MT 处理组 (P < 0.05)

在金鱼和欧洲鳊的研究中发现,雌二醇和睾酮可在脑和垂体两个水平发挥作用^[4,6,12,13]。在欧洲鳊的脑和垂体中存在着两种形式的内源 GnRH 分子, mGnRH 和 cGnRH-II, 其中 mGnRH 可能是调节欧洲鳊生殖活动的主要神经内分泌因子^[6,14]。注射雌二醇、雌二醇+睾酮或雌二醇+ADSD 可增加欧洲鳊脑部和垂体中 mGnRH 含量,说明性类固醇激素可直接作用于欧洲鳊的脑部促进 GnRH 的合成,从而促进垂体 GtH 合成和分泌^[6,9]。而且,雌二醇和睾酮可使欧洲鳊中编码 GtH II 的 β 亚基的 mRNA 含量增加,刺激 GtH II β 亚基基因的翻译前表达,从而使垂体 GtH 的合成增加^[15]。在金鱼中,雌二醇和睾酮可促进脑部神经肽 Y 和 γ -氨基丁酸的合成,进而促进 GnRH 的合成和分泌^[12,13,16,17];同时,性类固醇激素可直接作用于垂体,使 GnRH 受体数量发生变化或提高 GtH 细胞对 GnRH 的反应性,从而增加 GnRH 刺激的 GtH 分泌^[18,19]。本实验中,鉴于 ADSD 比 MT 促进雌鳊性腺发育成熟的效果好,着重探讨了埋植 ADSD 对雌性日本鳊脑部和垂体中 mGnRH 含量的影响。埋植 ADSD 1d 后,脑部和垂体中 mGnRH 含量明显增加,说明 ADSD 促进了脑部 mGnRH 合成;而埋植 1d 后垂体 mGnRH 含量的增加及埋植 2d 后垂体 mGnRH 含量和脑内 mGnRH 含量的降低,提示合成的 mGnRH 有一定程度的释放。由此推测,在日本鳊中,性类固醇激素可能直接作用于脑部促进 GnRH 的合成和分泌,从而促进垂体 GtH 合成和分泌。

在哺乳类的研究表明:垂体 GtH 细胞对 GnRH 的反应性依赖于 GnRH 的刺激时间、频率和幅度大小、垂体 GtH 细胞内 GtH 的储蓄量、膜上 GnRH 受体数量及 GnRH 与垂体 GnRH 受体结合能力等;另外,还和血清性类固醇激素水平有关^[20-23]。在日本鳊,血清 GtH 水平的动态变化显示,埋植 ADSD 后 1~5d 血清 GtH 水平升高,随后降低;而且,血清 GtH 上升幅度随着埋植 ADSD 次数的增加而增加。这可能是由于随着埋植 ADSD 次数的增加,日本鳊血清性类固醇激素水平升高^[8],GnRH 和 GtH 的合成增加;同时也可能引起 GtH 细胞对 GnRH 的反应性增加,或 GtH 细胞膜上 GnRH 受体数量增加,从而 GnRH 刺激的血清 GtH 水平上升的幅度增加。但是,MT 对血清 GtH 水平的明显影响仅在经过 7 次埋植后第 15d 观察到,其他时间埋植 MT 组血清 GtH 水平和对照组无显著差别,说明经过长期埋植 MT 刺激了垂体 GtH 的明显分泌,使埋植后第 15d 的血清 GtH 水平明显上升。在观察到血清 GtH 水平明显上升之前,埋植 MT 对雌性鳊性腺发育明显的促进作用提示,埋植 MT 可能促进了垂体 GtH 的缓慢释放,从而促进鳊性腺发育。在日本鳊中,ADSD 和 MT 均可明显促进垂体 GtH 的合成^[8],但两者促 GtH 分泌的作用存在显著差异,其原因还有待进一步探讨。ADSD 除了通过转变为睾酮起作用外,它还可能直接或间接的其他作用来影响性腺发育。

综上所述,埋植 ADSD 或 MT 可作用于脑和垂体两个水平,促进脑部 GnRH 和垂体 GtH 的合成和分泌,从而促进雌鳊的性腺发育成熟。所以,雄激素对性腺未发育成熟的雌性日本鳊在脑和垂体两个水平起正反馈调节作用。

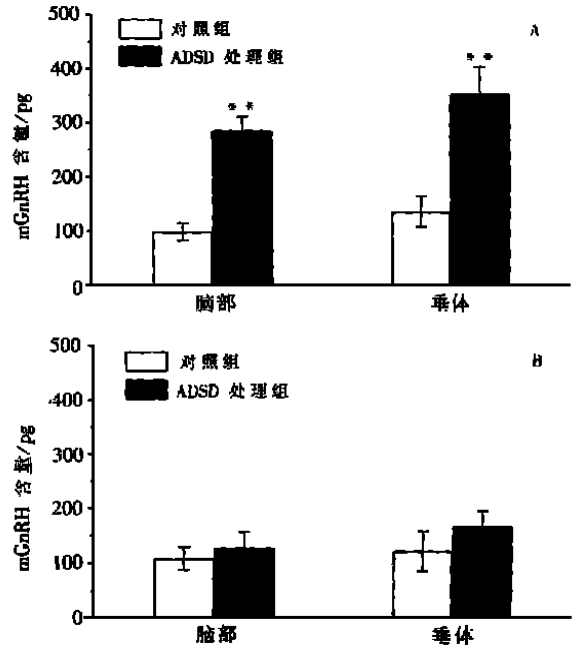


图3 埋植 ADSD 对脑和垂体 mGnRH 含量的影响
Fig. 3 Effects of implantation of ADSD on mGnRH contents in the whole brain and pituitary of female silver eel
A: 埋植 ADSD 后 1d 脑和垂体 mGnRH 含量
B: 埋植 ADSD 后 2d 脑和垂体 mGnRH 含量
各值表示为平均值±标准差(n=6)
* * 显著高于对照组(P<0.01)

参考文献:

- [1] 林浩然, 张梅丽, 张素敏, 等. 鳗鲡繁殖生物学研究 IV. 人工催熟过程中下海鳗鲡的 GnH 分泌活动、性腺发育状况和脑垂体 GnH 细胞的超显微结构[J]. 水生生物学报, 1987, 11(4): 320- 330.
- [2] 林浩然, 张梅丽, 张素敏, 等. 鳗鲡繁殖生物学研究 V. 性类固醇激素诱导雌鳗鲡促性腺激素(GnH)分泌和卵巢发育的作用[J]. 水生生物学报, 1994, 18(3): 272- 279.
- [3] 林浩然, 谢刚, 张利红, 等. 激素诱导鳗鲡性腺发育成熟和排卵的作用机理[A]. 中国动物科学研究[C]. 北京: 中国林业出版社, 1999. 42- 47.
- [4] Dufour S, Delerue-Le Belle N, Fontaine Y A. Effects of steroid hormone on pituitary immunoreactive gonadotropin in European freshwater eel, *Anguilla anguilla* L[J]. Gen Comp Endocrinol, 1983, 52: 190- 197.
- [5] Dufour S, Lopez E, Le Menn F, et al. Stimulation of gonadotropin releasing and of ovarian development, by the administration of a gonadoliberin agonist and of dopamine antagonists, in female silver eel pretreated with estradiol[J]. Gen Comp Endocrinol, 1988, 70:20- 30.
- [6] Dufour S, Montero M, Le belle N, et al. Differential distribution and response to experimental sexual maturation of two forms of brain gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the European eel, *Anguilla anguilla*[J]. Fish Physiol Biochem, 1993, 11: 99- 106.
- [7] Lin H R, Zhang M L, Zhang S M, et al. Effects of sex steroids, [D-Ala⁶, Pro⁹-N¹-ethylamide]-LHRH (LHRH-A) and domperidone (DOM) on gonadotropin secretion in female silver eel, *Anguilla japonica* Temminck & Schlegel[A]. The Second Asian Fisheries Forum[C]. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 1990, 591- 594.
- [8] Lin H, Xie G, Zhang L, et al. Artificial induction of gonadal maturation and ovulation in the Japanese eel (*Anguilla japonica*) [J]. Bull Fr Peche Piscic, 1998, 349:163- 176.
- [9] Montero M, Le Belle N, King J A, et al. Differential regulation of the two forms of gonadotropin-releasing hormone (mGnRH and cGnRH-II) by sex steroids in the European female silver eel (*Anguilla anguilla*) [J]. Neuroendocrinol, 1995, 61: 525- 535.
- [10] Yu K L, Nahorniak C S, Peter R E, et al. Brain distribution of radioimmuno-ssayable gonadotropin-releasing hormone in female goldfish: seasonal variation and periovulatory changes[J]. Gen Com Endocrinol, 1987, 67: 234- 246.
- [11] Crim L W, Peter R E, Billard R. Onset of gonadotropic hormone accumulation in the immature trout pituitary gland in response to estrogen or aromatizable androgen steroid hormones[J]. Gen Comp Endocrinol, 1981, 44: 374- 381.
- [12] Trudeau V L, Murthy C K, Habibi H R, et al. Effects of sex steroid treatments on gonadotropin-releasing hormone-stimulated gonadotropin secretion from the goldfish pituitary[J]. Biol Reprod, 1993, 48: 300- 307.
- [13] Trudeau V L, Soley B D, Peter R E. GABA stimulation of gonadotropin-goldfish: involvement of GABA_A receptors, dopamine, and sex steroids[J]. Am J Physiol, 1993, 265: 349- 355.
- [14] King J A, Dufour S, Fontaine Y A, et al. Chromatographic and immunological evidence for mammalian GnRH and chicken GnRH II in eel (*Anguilla anguilla*) brain and pituitary[J]. Peptides, 1990, 11: 507- 514.
- [15] Qu' erat B, Hardy D, Fontaine Y A. Regulation of the type-II gonadotropin α and β subunit mRNA by oestradiol and testosterone in the European eel[J]. J Mol Endocrinol, 1991, 7: 81- 86.
- [16] Peng C, Huang Y P, Peter R E. Seasonal variation of neuropeptide Y actions on growth hormone and gonadotropin-II secretion in the goldfish: effects of sex steroids[J]. J Neuroendocrinol, 1993, 5: 273- 280.
- [17] Peng C, Gallin W, Peter R E, et al. Neuropeptide Y gene expression in the goldfish brain distribution and regulation by ovarian steroids[J]. Endocrinology, 1994, 134(3): 1095- 1103.
- [18] Habibi H R, de Leeuw R, Nahorniuk C S, et al. Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor activity in goldfish and catfish: seasonal and gonadal effects[J]. Fish Physiol Biochem, 1989, 7:109- 118.
- [19] Trudeau V L, Peter R E, Soley B D. Testosterone and estradiol potentiate the serum gonadotropin response to gonadotropin releasing hormone in goldfish[J]. Biol Reprod, 1991, 44: 951- 960.
- [20] Badger T M, Loughlin J S, Naddaff P G. The luteinizing hormone releasing hormone (LHRH)-desensitized rat pituitary: luteinizing hormone responsiveness to LHRH in vitro[J]. Endocrinol, 1983, 112: 793- 799.
- [21] Gallo R V. Pulsatile LH release during periods of low level LH secretion in the rat estrus cycle[J]. Biol Reprod, 1981, 24: 771- 776.
- [22] Gay V L, Sheth N A. Evidence for a periodic release of LH in castrated male and female rats[J]. Endocrinology, 1972, 90: 158- 164.
- [23] Levine J E, Ramirez V D. Luteinizing hormone releasing-hormone during the rat estrous cycle and after ovariectomy, as estimated with push-pull cannulae[J]. Endocrinology, 1982, 111: 1439- 1448.