

LHRH-A、DA对施氏鲟脑垂体碎片释放GtH的影响

胡红霞¹, 张勇², 朱华^{1*}, 李立成¹, 姚志刚¹

(1. 北京市水产科学研究所暨国家淡水渔业工程技术研究中心(北京),
农业部都市农业(北方)重点实验室, 北京 100068;

2. 中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室,
中山大学水生经济动物研究所暨广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东 广州 510275)

摘要: 为了探讨在古老的软骨硬鳞鱼中促性腺激素(GtH)的双重内分泌调节作用, 本实验设计用离体灌流的方法研究促黄体素释放激素类似物(LHRH-A)和多巴胺(DA)对施氏鲟脑垂体碎片分泌GtH的影响。引入10、100和1 000 nmol/L 3个浓度的LHRH-A对施氏鲟脑垂体碎片3次脉冲式刺激实验; 每次间隔1 h, 持续5 min, 研究不同剂量LHRH-A对鲟鱼脑垂体释放GtH的作用; 用200 nmol/L DA对施氏鲟脑垂体碎片持续2 h灌流后引入5 min的1 000 nmol/L LHRH-A刺激实验, 研究DA如何抑制鲟鱼脑垂体释放GtH。每5 min收集一管灌流液, 用放射免疫测定法(RIA)检测灌流液中GtH的含量。结果显示, 低剂量LHRH-A随着刺激引入脑垂体释放GtH出现波浪式的增加, 中、高剂量出现释放延后现象。LHRH-A在10 nmol/L到1 000 nmol/L范围内对刺激脑垂体释放GtH没有剂量依存关系。DA对施氏鲟脑垂体碎片GtH的分泌没有显著影响, 但是可以抑制LHRH-A引起的GtH分泌, 即DA不能抑制施氏鲟GtH的基础分泌, 而只能抑制LHRH-A诱导的GtH分泌。研究结果证明, 在高等硬骨鱼类中存在的双重神经内分泌调节在古老的鲟鱼中也存在。

关键词: 施氏鲟; 脑垂体; 促黄体素释放激素类似物; 多巴胺; 促性腺激素; 离体灌流

中图分类号: Q 453; S 965

文献标志码: A

对许多高等硬骨鱼类的研究表明, 促性腺激素(GtH)的分泌释放不仅受到下丘脑分泌的促黄体素释放激素(LHRH)的促进作用, 同时还受到下丘脑释放的神经递质多巴胺(Dopamine, DA)的抑制性调节^[1-4]。GtH释放的双重内分泌调节机制最早在雌性金鱼中发现, 通过促性腺激素释放激素(GnRH)刺激GtH释放以及促性腺激素释放抑制因子(GRIF)抑制释放^[5]。DA作为GtH释放抑制因子可以抑制自发的和GnRH诱导的GtH的释放^[6-8]。

鲟形目鱼类(Acipenseriformes)是一类古老的软骨硬鳞鱼类, 在鱼类进化史上占有重要地位, 有活化石之称^[9]。分布于北半球北部, 为珍贵大型淡水经济鱼类, 具有重要的经济价值^[10], 在全

球范围内均处于不同程度的濒危状态, 全部被列为《濒危动植物种国际贸易公约》附录II物种^[11]。施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)是原产于中国的鲟鱼之一, 主要分布以黑龙江中游和松花江下游为多。非洄游性鱼类, 栖息于沙砾底质的江段, 喜贴江底游动, 很少进入浅水区, 地方名七粒浮子。无序地过度捕捞导致施氏鲟自然资源急剧减少^[12]。

GtH的双重内分泌调节对古老的软骨硬鳞鱼(如鲟鱼)的作用研究很少, 作用机理还没有完全研究清楚。随着我国鲟鱼养殖产业的飞速发展, 对鲟鱼繁殖内分泌的调控作用的研究, 不仅充实了硬骨鱼类繁殖内分泌调节的作用机理, 还通过了解人工养殖鲟鱼的繁殖内分泌调控, 提高鲟鱼的人工繁殖效率以促进产业发展。本研究用离体

收稿日期: 2013-09-22 修回日期: 2013-12-12

资助项目: 国家科技支撑计划(2012BAD26B05); 北京市科委项目(D121100003712002); 北京市现代农业产业技术体系(SCGWZJ20121102-1); 农业部公益性行业科研专项(201003055-05)

通信作者: 朱华, E-mail: zhuhua@bjfishery.com

灌注方法探讨了 LHRH-A、DA 对施氏鲟脑垂体碎片 GtH 的分泌调节作用。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

施氏鲟来自北京市水产科学研究所鲟鱼繁育基地,体质量 840 ~ 2 050 g,体长 54 ~ 59 cm,GSI: 2% ~ 2.6%。实验用试剂有 LHRH-A(宁波激素厂产品),DA 和 Cytodex III 微载体(Sigma 公司产品),抑菌酶素(Setva, USA),M199 培养基干粉(含 Hanks 盐)(GibcoBRL 公司)。

1.2 实验方法

施氏鲟脑垂体碎片的制备 将实验鱼断头取血,立即取出脑垂体,置于冰浴的平衡盐溶液 HBSS 中(含 25 mmol/L HEPES 和 0.1% 牛血清白蛋白,用 HBSS 清洗脑垂体 2 次。用手术刀片将脑垂体切成小于 1 mm³ 碎片,再用 HBSS 清洗脑垂体 2 ~ 3 次,然后将脑垂体分成实验所需的等份。根据预实验结果,每个灌注柱中应放相当于半个施氏鲟脑垂体碎片的量,可取得较稳定的激素基础分泌值。将每份脑垂体碎片转移到各自的灌注柱中,整个过程不超过 30 min。

脑垂体离体灌注孵育 脑垂体离体灌注实验参照本实验室建立的方法^[13]。在灌注柱中加入 200 μL 预处理的 Cytodex III 型微载体,在蠕动泵作用下使其沉积成 100 μL 厚的微载体层。加入实验所需要的脑垂体碎片,使之均匀地沉积在微载体层上,再加入 200 μL 预处理的 Cytodex III 型微载体,使脑垂体碎片夹在两层微载体之间。用 M199 培养液(含 Hanks 盐溶液、25 mmol/L HEPES 和 15 μg/mL 抑菌酶素)预灌注过夜(10 ~ 12 h,流速为 5 mL/h),实验前 2 h 用 HBSS 替代 M199 培养液,并将流速调到 15 mL/h,继续预灌注 2 h,以建立稳定的激素基础分泌,灌注温度为(19 ± 1) °C。用自动收集器每 5 或 10 min 收集 1 管灌注液样品,贮存于 -20 °C 的低温冰箱中待测激素含量。

脉冲式 LHRH-A 刺激对施氏鲟离体脑垂体碎片 GtH 分泌的影响 同一灌注柱每间隔 1 h 引入一个相同浓度的 LHRH-A 刺激,每次 3 个灌注柱,LHRH-A 的 3 个实验浓度分别为 10、100 和 1 000 nmol/L。灌注时流速为 15 mL/h,每 5 min 收集 1 管。每次实验用鱼 3 尾,实验重复 3 次(表 1)。

表 1 重复脉冲式 LHRH-A 刺激对施氏鲟脑垂体碎片 GtH 分泌的影响
Tab. 1 The experimental design for the effect of pulse LHRH-A administration on GtH secretion from the pituitary fragments of Amur sturgeon *in vitro*

时间/min time	处理方式			流速/(mL/h) speed	收集管号 fraction no.
	灌注柱 1 column1	灌注柱 2 column2	灌注柱 3 column3		
480 ~ 600	M199	5			
90	HBSS	15			
30	HBSS	15	1 ~ 6		
5	10 nmol/L LHRH-A	100 nmol/L LHRH-A	1 000 nmol/L LHRH-A	15	7
60	HBSS	15	8 ~ 19		
5	10 nmol/L LHRH-A	100 nmol/L LHRH-A	1 000 nmol/L LHRH-A	15	20
60	HBSS	15	21-32		
5	10 nmol/L LHRH-A	100 nmol/L LHRH-A	1 000 nmol/L LHRH-A	15	33
60	HBSS	15	34 ~ 45		

DA 对施氏鲟脑垂体碎片 GtH 分泌的影响

实验同时采用 3 个灌注柱,一个对照组,两个实验组,实验重复两次,每次实验鱼 2 尾,灌注时流速为 15 mL/h,每 5 min 收集一管。DA 先用乙醇溶解,再用 HBSS 配成 100 μmol/L 储存液储存于 -20 °C,使用前用 HBSS 稀释到所需浓度(表 2)。

灌注液中鲟鱼 GtH 的测定 鲟鱼 GtH 的

测定方法根据胡红霞等^[14]建立的放射免疫方法进行测定:以从鲟鱼脑垂体分离提纯的促性腺激素 stGtH(sturgeon GtH)为标记抗原和标准品,用¹²⁵I 标记抗原,第一抗体为兔抗鲟鱼血清(Rast GtH),第 2 抗体为羊抗兔 γ 球蛋白血清(GAR),建立竞争性放射免疫测定法。取 50 μL 标准品 stGtH(浓度为 200、100、50、25、20、10、5、2.5、

1.25、0.64 ng/mL)、质控(12.5和1.25 ng/mL stGtH)和待测样品分别加入200 μ L 兔抗 stGtH 血清(RAst)稀释液中(稀释度为1:25 000),混匀后在4 $^{\circ}$ C 孵育;第二天加入200 mL¹²⁵I 标记的 stGtH(15 000 cpm/200 μ L 稀释液);混匀后在4 $^{\circ}$ C 孵育;第3天加入200 μ L 羊抗兔血清(GAR, 1:15),24 h 内摇动2次,4 $^{\circ}$ C 孵育;第4天在4 $^{\circ}$ C 下进行冷冻离心30 min(4 000 r/min),去上清液后在 COBRA II AU TO GAMMA 计数仪上测 cpm,以稀释度为横坐标,以 B/B0 为纵坐标做标准曲线,最后横纵坐标经对数转换。

表2 DA对施氏鲟脑垂体碎片GtH分泌影响实验设计
Tab.2 The experimental design for the effect of DA administration on the GtH release from the pituitary fragments of *A. schrenckii* in vitro

时间/min time	处理方式 treatment	流速/(mL/h) speed	收集管号 fraction no.
480~600	M199	5	
120	HBSS	15	
35	HBSS	15	1~7
120	200 nmol/LDA	15	8~31
5	1 000 nmol/L LHRH-A	15	32
60	200 nmol/LDA	15	33~44
60	HBSS	15	45~56

1.3 激素分泌反应的计算方法及数据分析

脑垂体对持续刺激的激素分泌反应以每小时激素分泌率表示,其计算方法参照 Habibi 等^[15]的方法并稍作修改。引入刺激前30 min(3管)的激素含量平均值作为刺激前基础分泌值,持续性刺激对基础 GtH 分泌的影响定量为持续反应期间每1小时内各管(共6管)收集反应的激素含量,再把此值转化为引入刺激前基础分泌值的百分数。

脑垂体对重复脉冲刺激的激素分泌反应计算方法有两种:(1)把每个刺激之前的3管收集液激素含量的平均值作为基础分泌值,将各刺激后30 min内各管(共6管)的激素反应值减去基础分泌值的总和,转化为各自刺激前的基础分泌的百分数。它表示外源激素刺激的激素分泌反应值。(2)将第一次刺激前的3管收集液平均值作为基础分泌,将各刺激后30 min内各管(共6管)的激素反应值减去基础分泌后的总和,转化为第一次刺激前基础分泌的百分数。它表示的是基础的加上外源激素刺激的激素反应值(反应总值)。

实验数据以平均值 \pm 标准误(mean \pm SE)表示,用 SPSS 统计软件中 Duncan 检验($P < 0.05$)和 Student's T 检验。

2 结果

2.1 重复脉冲式 LHRH-A 刺激对施氏鲟脑垂体碎片 GtH 分泌的影响

施氏鲟脑垂体碎片对重复脉冲 LHRH-A 刺激反应的灌流进程图表现出每次引入的刺激均能加强脑垂体 GtH 的分泌,间隔1 h 给予一个5 min 的刺激能产生3个明显的 GtH 分泌反应峰,然后在30~40 min 内下降至高于第一刺激前基础值的某一水平并保持稳定(图1)。

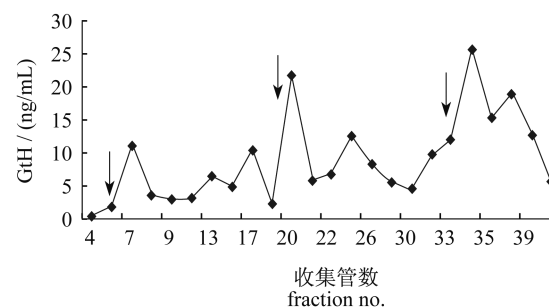


图1 LHRH-A 重复脉冲刺激对施氏鲟幼鱼脑垂体释放 GtH 灌流进程图

黑箭头代表引入的5 min 的10 nmol/L 的 LHRH-A 刺激

Fig.1 GtH release profile of LHRH-A pulse stimulation to the pituitary fragment of young fish Amur sturgeon

Black arrows indicate the introduction of five minutes of LHRH-A (10 nmol/L) stimulations

引入3个剂量的 LHRH-A 都能刺激脑垂体 GtH 分泌的增加,随刺激剂量增大 GtH 绝对值增加(图2);但10 nmol/L 的第一次刺激百分数(图3)增加幅度最大,100和1 000 nmol/L 的后两次刺激没有第一次刺激百分数增加显著。

重复脉冲 LHRH-A 刺激对施氏鲟幼鱼离体脑垂体碎片基础 GtH 分泌的影响,第二次刺激和第三次刺激前的基础 GtH 分泌没有显著差异,但它们都显著高于第一次刺激前的基础 GtH 水平。第二次和第三次刺激前的基础 GtH 水平分别约为第一次刺激前的2.7~5.7倍和1.3~6.4倍(表3)。10、100和1 000 nmol/L LHRH-A 对基础 GtH 分泌有显著差异。表明脉冲 LHRH-A 刺激可使性腺发育没有成熟的施氏鲟离体脑垂体基

础的 GtH 分泌增加。

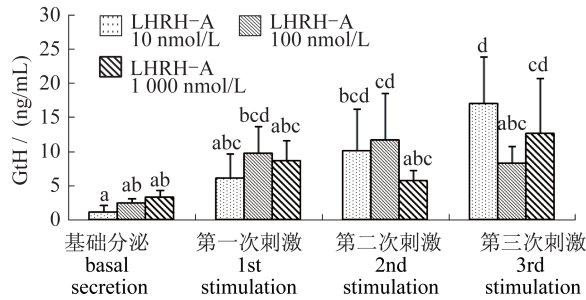


图2 重复脉冲 LHRH-A 3 次刺激施氏
鲟离体脑垂体碎片 GtH 的分泌
Fig.2 Comparison of GtH secretion of
three times stimulating of LHRH-A on
the pituitary fragment in vitro

表3 每次 LHRH-A 刺激前 GtH 基础分泌值与第一次刺激前基础分泌值比较
Tab.3 Comparison of the basal GtH secretion before each LHRH-A introducing with
the GtH level before the first stimulation

	LHRH-A 10 nmol/L		LHRH-A 100 nmol/L		LHRH-A 1 000 nmol/L	
	GtH 含量/(ng/mL) GtH level	比值 ratio	GtH 含量/(ng/mL) GtH level	比值 ratio	GtH 含量/(ng/mL) GtH level	比值 ratio
第一次刺激前 Before 1st stimulation	1.13 ± 0.98	1	2.53 ± 0.58	1	3.39 ± 0.96	1
第二次刺激前 Before 2nd stimulation	6.49 ± 5.91	5.7	9.98 ± 3.59	3.9	9.20 ± 1.13	2.7
第三次刺激前 Before 3rd stimulation	7.2 ± 3.78	6.4	8.95 ± 4.97	3.5	4.40 ± 0.33	1.3

将各脉冲刺激的 GtH 分泌反应值转化为各自刺激前的基础分泌的百分数,10、100 和 1 000 nmol/L 的 LHRH-A 第一次刺激的 GtH 分泌反应分别为基础分泌的 5.46、3.87 和 2.58 倍,不存在剂量依存关系。随着引入第二和第三次不同剂量 LHRH-A 刺激,GtH 分泌第一次刺激百分数和基础分泌百分数没有随剂量增加而增大(图 3、图 4);表明重复脉冲 LHRH-A 刺激能够增强未成

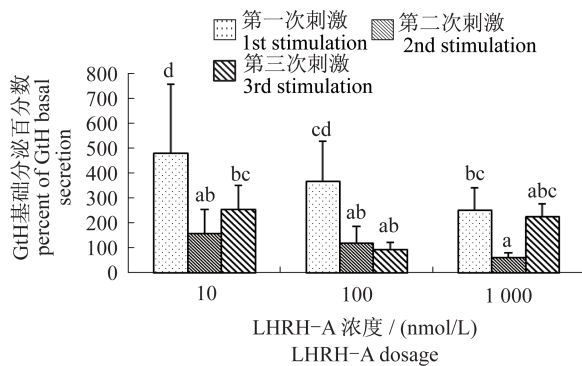


图4 不同剂量重复脉冲刺激施氏
鲟脑垂体基础分泌百分数

Fig.4 Percent of GtH basal secretion from *A. schrenckii*
pituitary after different dosage LHRH-A introducing

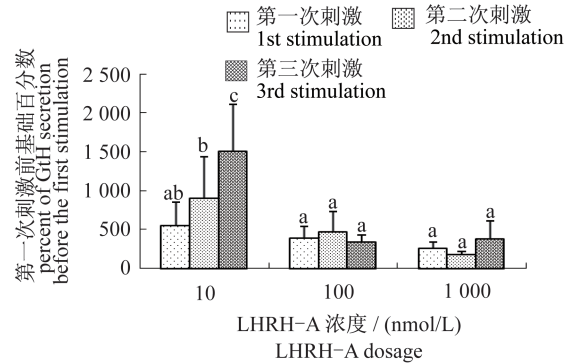


图3 重复脉冲 LHRH-A 3 次刺激施氏
鲟脑垂体碎片的 GtH 第一刺激前分泌百分数
Fig.3 Percent of GtH secretion before the
first stimulation of different dosages LHRH-A
introducing to *A. schrenckii* pituitary fragment

熟施氏鲟离体脑垂体基础的 GtH 分泌,而且低剂量多次比高剂量效果好。

2.2 DA 对施氏鲟脑垂体碎片 GtH 释放的影响

引入持续 2 h 的 200 nmol/L DA 刺激后,GtH 的分泌量与对照组没有显著差异,2 h 后引入一个 5 min 1 000 nmol/L 的 LHRH-A 刺激,GtH 分泌出现一个峰值,随后很快降低(图 5)。

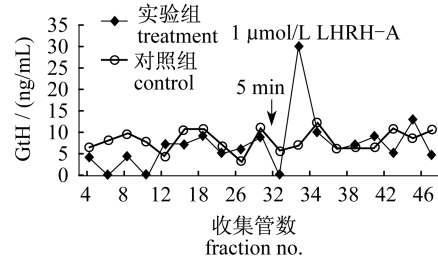


图5 DA 对施氏鲟脑垂体 GtH 分泌的作用
Fig.5 DA effect on the pituitary fragment
GtH secretion of *A. schrenckii*

3 讨论

3.1 脉冲式 LHRH-A 刺激对施氏鲟 GtH 释放的影响

不同剂量 LHRH-A 离体灌流低剂量组随刺

激的引入出现 GtH 释放波浪式的增加,中、高剂量出现释放延后现象,表明高剂量 LHRH-A 对 GtH 的释放有“自身抑制作用”。低(10 nmol/L)、中(100 nmol/L)和高(1 000 nmol/L)3种剂量的 LHRH-A 促使 GtH 的释放增高的幅度相近(均为 27 ng/uL 左右),可见对于性腺发育没有成熟的鲟鱼,LHRH-A 在 10 ~ 1 000 nmol/L 内对 GtH 释放作用没有剂量依存关系。由此推测 LHRH-A 对于鲟鱼脑垂体的作用可能存在一个阈值,超过这个阈值的刺激对脑垂体 GtH 的释放就没有剂量依存关系,随着刺激剂量的升高还会出现自身抑制作用,也许在低于 10 nmol/L 的范围内存在剂量依存关系。对金鱼诱导 GtH 分泌和性腺发育成熟的作用中也存在低剂量 LHRH-A 的“自身增强作用”和高剂量 LHRH-A 的“自身抑制作用”^[16]。结合本实验结果,推测应用 LHRH-A 促进施氏鲟幼鱼性腺发育或催熟,少剂量多次的 LHRH-A 刺激应该比高剂量效果更好。

3.2 DA 对施氏鲟脑垂体碎片释放 GtH 的影响

DA 对金鱼 (*Carassius auratus*)^[17]、幼鲤 (*Cyprinus carpio*) 和性腺退化期成鲤^[18]、性腺发育期雄鳗 (*Anguilla japonica*)^[19]、性腺退化期鲇鱼 (*Silurus asotus*)^[13] 脑垂体碎片的 GtH 释放有抑制作用。本实验使用的施氏鲟性腺发育处于 II 期,实验表明 DA 对性腺发育早期施氏鲟脑垂体碎片的 GtH 的分泌没有显著影响。但是可以抑制 LHRH-A 引起的 GtH 分泌,使其很快降低,和大鳍鲮 (*Mystus macropterus*)^[20] 的在体实验及长臀鲮 (*Cranoglanis boudierius*)^[21] 的离体实验结果相似,即 DA 不能抑制施氏鲟 GtH 的基础分泌,而只能抑制 LHRH-A 诱导 GtH 的分泌。对成熟雄性白鲟的催产也表明 DA 单独使用没有对血浆 GtH 的基础分泌产生显著影响,但作为 GtH 释放抑制因子的功能体现在抑制由 LHRH-A 诱导的 GtH I 和 GtH II 的释放,还显著影响排精,实际上在注射 GnRH_a 后 6 h 引入 DA 也没有完全抑制排精^[22]。本实验中 DA 也没有能够完全抑制 LHRH-A 的作用,仍然可以出现 GtH 释放的增加。

大多数高等硬骨鱼类的研究推测 DA 直接作用于 GtH 细胞来抑制 GtH 的分泌^[9,23]。已经证明 DA 与脑垂体中 GtH 分泌细胞上多巴胺的 D2 受体有关,而且 DA 还能降低脑垂体中 GnRH 受

体的表达来抑制 GtH 的分泌^[24]。与高等硬骨鱼类不同,鲟鱼有类似于哺乳动物的下丘脑-垂体门脉系统,如果鲟鱼和哺乳动物类似对 DA 存在血脑屏障,推测 DA 作用位置可能在脑垂体水平^[22]。许多研究证明了 LHRH 的结合能力与 LHRH 反应的关系,因此可能是 DA 对 LHRH 受体的下调作用减少了 GtH 的分泌。然而,对金鱼的其他研究表明,培养分散的脑垂体细胞,DA 直接抑制了没有受到诱发的 GtH 的释放。本实验还不能充分说明 LHRH 受体或 DA 作用于鲟鱼的机制,需要进一步研究。本研究结果表明,DA 可以抑制 LHRH-A 诱导的性腺发育早期施氏鲟脑垂体 GtH 释放,这进一步证明了在古老的鲟鱼中也存在与高等硬骨鱼类中相似的双重神经内分泌调节机制。

参考文献:

- [1] Stojilkovic S S, Rojas E, Stutzin A, et al. Desensitization of pituitary gonadotropin secretion by agonist-induced inactivation of voltage-sensitive calcium channels [J]. Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(19): 10939 - 10944.
- [2] Evans W S, Uskavitch D R, Kaiser D L, et al. The self-priming effect of gonadotropin-releasing hormone on luteinizing hormone release: Observations using rat anterior pituitary fragments and dispersed cells continually perfused in parallel [J]. Endocrinology, 1984, 114(3): 861 - 868.
- [3] De Leeuw R, Goos H J Th, Van Oordt P G W J. The regulation of gonadotropin release by neurohormones and gonadal steroids in the African catfish, *Clarias gariepinus* [J]. Aquaculture, 1987, 63(1-4): 43 - 58.
- [4] Lin H R, Van Der Kraak G, Zhou X J, et al. Effects of [D-Arg⁶, Trp⁷, Leu⁸, Pro⁹ Net]-luteinizing hormone-releasing hormone (sGnRH-A) and [D-Ala⁶, Pro⁹ Net]-luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH-A), in combination with pimozide or domperidone, on gonadotropin release and ovulation in the Chinese loach and common carp [J]. General and Comparative Endocrinology, 1988, 69(1): 31 - 40.
- [5] Peter R E. Neuroendocrine control of reproduction teleosts [J]. Canadian Journal of Fish Aquatic Science, 1982, 39(1): 48 - 55.
- [6] Chang J P, Peter R E. Effect of dopamine on

- gonadotropin release in female goldfish. *Carassius auratus* [J]. *Neuroendocrinology*, 1983, 36 (5): 351 - 357.
- [7] Chang J P, MacKenzie D S, Gould D R, *et al.* Effect of dopamine and norepinephrine on *in Vitro* apontaneous and gonadotropin-releasing hormone-induced gonadotropin release by dispersed cells of fragments of goldfish pituitary [J]. *Life Science*, 1984, 35(20):2027 - 2033.
- [8] Chang J P, Peter R E, Crim L W. Effect of dopamine and apomorphine on gonadotropin release from the transplanted pars distails in goldfish. [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1984, 55 (3): 347 - 350.
- [9] Gardiner B G. Sturgeons as living fossils [M] // Eldredge N, Stanley S M, eds. *Living Fossils*. New York: Springer-Verlag Press, 1984:148 - 152.
- [10] Bemis W E, Kynard B. Sturgeon rivers: An introduction to *Acipenseriform* biogeography and life history [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 1997, 48(1 - 4):167 - 183.
- [11] Bemis W E, Findeis E K. The sturgeons plight. [J]. *Nature*, 1994, 370:602.
- [12] Krykhtin M L, Svirskii V G. Endemic sturgeons of the Amur River: Kaluga, *Huso dauricus*, and Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii* [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 1997, 48(1 - 4):231 - 239.
- [13] Wen H S, Lin H R. Effect of LHRH-A and domperidone on gonadotropin releasing in *Silurus asotus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, 25 (5):393 - 397. [温海深, 林浩然. 促黄体素释放激素和多巴胺拮抗物对鲢促性腺激素释放的作用. *水产学报*, 2001, 25(5):393 - 397.]
- [14] Hu H X, Liu X C, Zhu H, *et al.* Setting up radioimmunoassay for sturgeon gonadotropin GtH and assay of *Amur sturgeon* serum GtH after inducing ovulation [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32 (6): 817 - 824. [胡红霞, 刘晓春, 朱华, 等. 鲟鱼 GtH 放射免疫测定方法的建立及催产前后史氏鲟血清 GtH 含量的变化. *水产学报*, 2008, 32(6):817 - 824.]
- [15] Habibi H R, De Leeuw R, Nahorniak C S, *et al.* Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor activity in goldfish and catfish: Seasonal and gonadal effects [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1989, 7(1 - 6):109 - 118.
- [16] Lin H R. *Fish Physiology* [M]. Guangzhou: Guangdong Higher Education Press, 1999:158 - 165. [林浩然. *鱼类生理学*. 广州: 广东高等教育出版社, 1999:158 - 165.]
- [17] Omeljaniuk R J, Shih S H, Peter R E. In-vivo evaluation of dopamine receptor-mediated inhibition of gonadotropin secretion from the pituitary gland of goldfish *Carassius auratus* [J]. *The Journal of Endocrinology*, 1987, 114(3):449 - 458.
- [18] Wang L, Lin H R. Effects of lhrh a and da on growth hormone secretion in juvenile and mature female common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1997(3):303 - 308. [王黎, 林浩然. 促黄体素释放激素类似物和多巴胺对鲤鱼幼鱼和性成熟雌鱼生长激素分泌的作用. *动物学报*, 1997, 43 (3):303 - 308.]
- [19] Wang X D. Steroid induced eel gonad maturity and ovulation of research [D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 1998:48 - 62. [汪小东. 激素诱导鳗鲡性腺发育成熟和排卵的研究. 广州: 中山大学, 1998:48 - 62.]
- [20] Wang D S, Lin H R, H. J. Th. GOOS. Studies on the regulation of gonadotropin secretion in the bagrid catfish, *Mystus macropterus* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1998, 44 (3):322 - 328. [王德寿, 林浩然, H. J. Th. 谷斯. 大鳍鲮促性腺激素分泌调控的研究. *动物学报*, 1998, 44(3):322 - 328.]
- [21] Zhou L B, Liu X C, Lin H R, *et al.* Changes in pituitary and serum gonadotropin levels in helmet catfish at different stages of ovarian development [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2003, 49(3):399 - 403. [周立斌, 刘晓春, 林浩然, 等. 长臀鲮脑垂体和血清中促性腺激素的生殖周期变化. *动物学报*, 2003, 49 (3):399 - 403.]
- [22] Pavlick R J, Moberg G P. Dopaminergic influence on gonadotropin secretion in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1997, 16(1):35 - 43.
- [23] De Leeuw R, Van't Veer C, Goos H J T, *et al.* The dopaminergic regulation of gonadotropin-releasing hormone receptor binding in the pituitary of the African catfish *Clarias gariepinus* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1988, 72 (3): 408 - 415.
- [24] Chang J P, Johnson J D, Sawisky G R, *et al.* Signal transduction in multifactorial neuroendocrine control of gonadotropin secretion and synthesis in teleosts—studies on the goldfish model [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 161:42 - 52.

LHRH-A and DA effect on GtH release from pituitary fragments of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) *in vitro*

HU Hongxia¹, ZHANG Yong², ZHU Hua^{1*}, LI Licheng¹, YAO Zhigang¹

(1. Beijing Fisheries Research Institute, National Freshwater Fisheries Engineering Technology Research Center, Beijing 100068, China;

2. Institute of Aquatic Economic Animals, and Guangdong Province Key Laboratory for Aquatic Economic Animals, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: In order to study the dual endocrine effect on the gonadotropin release of pituitary in the ancient Chondrostei fish, luteinizing hormone releasing hormone analog (LHRH-A) and dopamine (DA) were used *in vitro* to research their effect on gonadotropin release of pituitary fragment in Amur sturgeon (*A. schrenckii*). Two experiments were designed to study how the LHRH-A and DA affect the GtH release of pituitary fragment; Three times repetitive pulse stimulation of 10, 100 and 1 000 nmol/L different dosages of LHRH-A were introduced every one hour for five minutes, perfusion; And then after two hours, perfusion of 200 nmol/L DA, 1 000 nmol/L LHRH-stimulation was introduced for five minutes. The perfusate was collected every five minutes to test the GtH content using Radio Immunoassay (RIA) method. The results showed that repetitive pulse administration of LHRH-A was able to be stimulating GtH release from the pituitary fragments *in vitro* in Amur sturgeon, without dose-dependent manner at the dosage from 10 nmol/L to 1 000 nmol/L. It seemed LHRH-A at high concentration restrained the release of GtH by itself. Dopamine (DA) had no obvious effect on basal GtH secretion of pituitary while it could restrain the GtH release of pituitary fragment induced by LHRH-A. It proved that dual endocrine regulation of GtH release also existed in sturgeon.

Key words: *Acipenser schrenckii* pituitary; LHRH-A; dopamine; gonadotropin; *in vitro*

Corresponding author: ZHU Hua. E-mail: zhuhua@bjfishery.com