

促性腺激素释放激素类似物促进 鱼类生长激素分泌和生长

林信伟 林浩然

张庆

(中山大学生物系, 广州 510275)

(南海水产研究所, 广州 510300)

摘要 采用离体灌流孵育和腹腔注射方法, 研究鲑鱼促性腺激素释放激素(GnRH)类似物 sGnRH-A (Arg⁶Trp⁷Leu⁸Pro⁹NET-LHRH) 和哺乳类GnRH类似物LHRH-A (Ala⁶Pro⁹NET-LHRH) 对鲤鱼脑垂体生长激素(GH)分泌的直接刺激作用以及对草鱼鱼种GH分泌和生长的促进作用。2分钟脉冲式 sGnRH-A 和 LHRH-A 以剂量依存形式直接刺激离体灌流孵育的鲤鱼脑垂体GH分泌, 且 sGnRH-A 刺激GH分泌活性显著高于LHRH-A。腹腔注射两种剂量(0.01μg/g体重/周和0.001μg/g体重/周)的 sGnRH-A 或 LHRH-A (每周一次, 共6周) 都能显著提高草鱼鱼种相对体重和相对体长增长率, 并促进草鱼鱼种血清GH水平提高。sGnRH-A 和 LHRH-A 促进生长的作用是剂量依存的, 且 sGnRH-A 的促进生长作用显著高于LHRH-A。

关键词 促性腺激素释放激素, 生长激素, 生长, 鲤鱼, 草鱼

鱼类的生长激素(GH)已被证明对促进鱼类生长起重要作用。通过加强鱼类自身的GH(内源的)的合成与分泌, 或施以外源的GH, 都可以提高鱼的生长速率[Billard, R., 1989; Donaldson 等, 1979; Zohar, Y., 1989]。近几年, 对金鱼和鲤鱼等鱼类脑垂体GH分泌的神经内分泌调节机理的研究取得初步进展, 证明促性腺激素释放激素(GnRH)可做为GH释放因子, 刺激脑垂体GH分泌[Chang 等, 1990; Lin 等, 1993; Marchant 等, 1989], 并且体内注射GnRH及其类似物还可促进金鱼体长生长[Marchant, T. A. 等, 1989]。

本文以我国主要养殖鱼类鲤鱼和草鱼为材料, 采用离体和在体方法, 研究哺乳类GnRH(LHRH)和鲑鱼GnRH(sGnRH)的两种高效类似物LHRH-A(Ala⁶Pro⁹NET-LHRH)和sGnRH-A(Arg⁶Trp⁷Leu⁸Pro⁹NET-LHRH)刺激GH分泌和促进草鱼鱼种生长的作用, 旨在探讨GnRH高效类似物促进养殖鱼类GH分泌和生长速率提高的作用及其应用前景。

一、材料和方法

1. 实验鱼及其驯养 性腺正在发育的鲤鱼(不分性别), 体重410—600g, 性腺成熟系数为6.2—15.7%, 购自广州农贸市场, 实验前在室温和自然光周期下暂养于室内水族

箱中。草鱼鱼种体重 18—30g, 购自广州郊区鱼塘。草鱼鱼种驯养于 250 升水族箱中, 自然光照并控制水温在 21°C 左右, 24 小时通氧和水流循环过滤, 实验前暂养 1—2 周, 直到适应新环境并开口摄食人工饵料为止。

2. 在体实验 草鱼鱼种分成 5 组, 每组 10 尾鱼。5 组鱼分别腹腔注射①生理盐水 (VEH), 即对照; ②低剂量 LHRH-A (0.001 μ g/g 体重/周); ③高剂量 LHRH-A (0.01 μ g/g 体重/周); ④低剂量 sGnRH-A (0.001 μ g/g 体重/周); ⑤高剂量 sGnRH-A (0.01 μ g/g 体重/周)。每周注射一次, 共进行 6 周。GnRH 类似物均用 VEH (0.7% NaCl 和 0.1% 偏重亚硫酸钠混合液) 配制。实验期间, 根据草鱼鱼种实际需要量投喂人工饵料, 以喂饱为止。每周测量一次体重和体长 (标准体长)。实验结束时, 草鱼鱼种用 MS-222 麻醉, 由尾静脉抽血获得血样。血样在 4°C 下静置几小时后, 15000 转/分离心 4 分钟, 收集血清样品用于测定 GH 含量。

3. 离体实验 采用的鲤鱼脑垂体碎片离体灌流孵育系统 (perifusion) 参照金鱼脑垂体碎片的离体灌流孵育系统 [Habibi, H. R. 等, 1989], 稍作修改。鲤鱼断头放血后取出脑垂体 (腺垂体部) 制备成碎片, 将每份相当于半个脑垂体的碎片分别转移到柱状灌流孵育室中, 并置碎片于两层 Cytodex 微载体之间。脑垂体碎片先用 199 培养液 (含 Hanks 盐溶液、25mM HEPES 和 15U/ml 制霉菌素) 预灌流 8—10hr, 实验前 2hr, 将 199 培养液换成 Hanks 平衡盐溶液 (含 25mM HEPES 和 0.1% 牛血清白蛋白, 简称 HBSS)。预灌流之后, 以 1hr 间隔引入 3 个 2 分钟不同剂量 (1、10 和 100nM) 的 sGnRH-A 或 LHRH-A 脉冲式刺激。每个灌流柱测试一种 GnRH 类似物, 每种类似物重复 4 次实验。灌流孵育温度为 19 \pm 1°C, 收集 5 分钟一管的样品。GnRH 类似物在实验前用 HBSS 配成 10 μ M 贮存液, 实验时再用 HBSS 稀释至所需浓度。LHRH-A 购自宁波市激素制品厂; sGnRH-A 由美国加州 Salk 研究所 J. Rivier 和 W. Vale 合成并赠送。

4. 激素测定和数据分析方法 样品 (血清和灌流收集液) 中 GH 含量测定采用在本实验室建立的鲤鱼 GH 放射免疫测定法 [Marchant 等, 1989]。草鱼鱼种生长速率分别用相对体长增长率 (RLGR) 和相对体重增长率 (RSGR) 表示 [Ricker, W. E., 1979], 其计算公式如下:

$$RSGR = \frac{t \text{ 时间后的体重} - \text{起始时间的体重}}{\text{起始时间的体重}} \times 100\%$$

$$RLGR = \frac{t \text{ 时间后的体长} - \text{起始时间的体长}}{\text{起始时间的体长}} \times 100\%$$

鲤鱼脑垂体碎片对脉冲式 GnRH 类似物刺激的 GH 分泌反应值的定量分析参照 Habibi 等 [1989], 即将每个刺激前的三管样品 (15 分钟) 的 GH 含量平均值做为平均刺激前基础分泌值 (prepulse), 把脑垂体碎片对脉冲式 GnRH 类似物刺激的 GH 分泌反应值定量为 30 分钟内激素分泌反应净值之和, 再将此值转换为各自刺激前平均基础分泌值的百分数 (% prepulse)。数据以平均值 \pm 标准差表示。各给药组与对照组之间的生长速率和血清 GH 水平差异采用 *t* 检验; 离体实验中各种剂量 GnRH 类似物以及两种 GnRH 类似物刺激 GH 分泌反应值之间的差异采用 Duncan 氏新复极差检验, 当 *P* < 0.05 时, 认为差异显著。

二、实验结果

注射 sGnRH-A 和 LHRH-A 对草鱼鱼种生长有显著的促进作用,图中有星标(☆)者显著高于对照组(图 1)。注射 6 周后,低剂量 LHRH-A、高剂量 LHRH-A、低剂量 sGnRH-A、高剂量 sGnRH-A 以及对照组的 RSGR 和 RLGR 分别为 19.1%、20.8%、23.9%、27.6%、10.6%和 6.0%、6.1%、6.7%、8.1%、3.8%。四个药物注射组的 RSGR 和 RLGR 分别显著高于对照组。同种 GnRH 类似物中,高剂量组的 RSGR 和 RLGR 都分别显著高于低剂量组。同剂量不同 GnRH 类似物中,注射 sGnRH-A 组的 RSGR 和 RLGR 分别显著高于注射 LHRH-A 组。

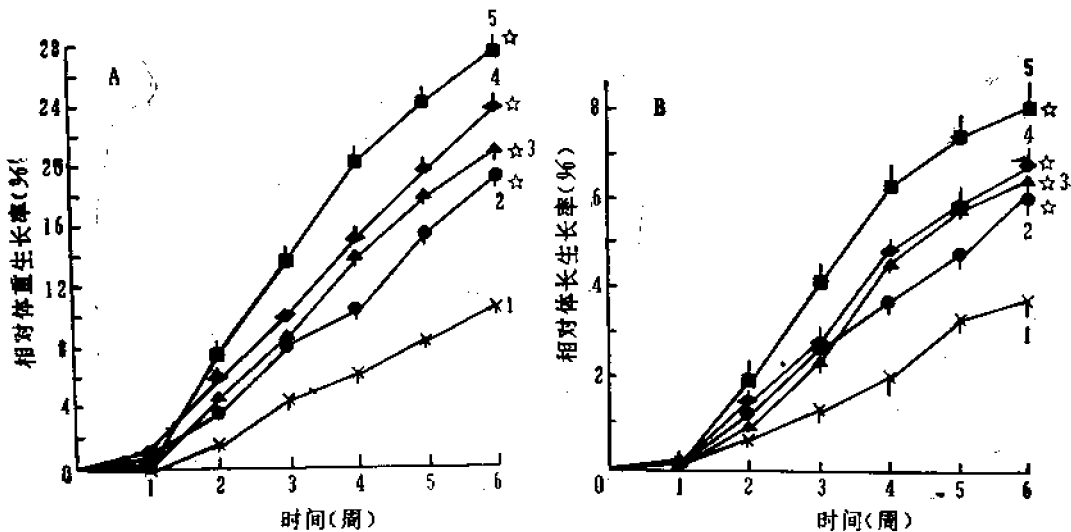


图1 腹腔注射 sGnRH-A 或 LHRH-A 对草鱼鱼种体重(A)和体长(B)生长的促进作用

Fig. 1 Growth-promoting effects of i. p. injection of LHRH-A or sGnRH-A on body weight and length of grass carp fingerling

1. VEH; 2. LHRH-A(0.001µg/g 体重/周); 3. LHRH-A(0.01µg/g 体重/周); 4. sGnRH-A(0.001µg/g 体重/周); 5. sGnRH-A(0.01µg/g 体重/周)

注射 sGnRH-A 和 LHRH-A 6 周后,草鱼鱼种的血清 GH 水平均高于对照组,但只有注射高剂量 LHRH-A 组的血清 GH 水平与对照组之间有显著差异,图中有星标(☆)者,显著高于对照组(图 2)。

离体灌流孵育的鲤鱼脑垂体碎片接受 2 分钟不同剂量 sGnRH-A 或 LHRH-A 刺激后,都迅速产生一个剂量依存的 GH 分泌反应。GH 分泌在刺激后 10 分钟内达到最大值,整个 GH 分泌反应峰持续约 30 分钟,然后恢复到基础水平(图 3)。两种 GnRH 类似物刺激离体脑垂体 GH 分泌的定量分析结果见图 4。三种剂量 sGnRH-A 刺激的 GH 分泌反应都分别显著高于同剂量 LHRH-A 刺激的 GH 分泌反应;在同种 GnRH 类似物中,三种剂量的作用之间也存在显著差异(图 4)。

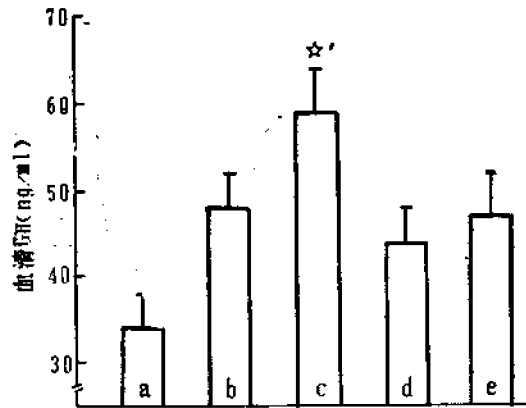


图2 腹腔注射 sGnRH-A 或 LHRH-A 对草鱼鱼种血清 GH 水平的影响

Fig. 2 Effects of i. p. injection of LHRH-A or sGnRH-A on serum GH levels of grass carp fingerling

a. VEH; b. LHRH-A(0.001µg/g 体重/周); c. LHRH-A(0.01µg/g 体重/周); d. sGnRH-A (0.001µg/g 体重/周); e. sGnRH-A(0.01µg/g 体重/周)

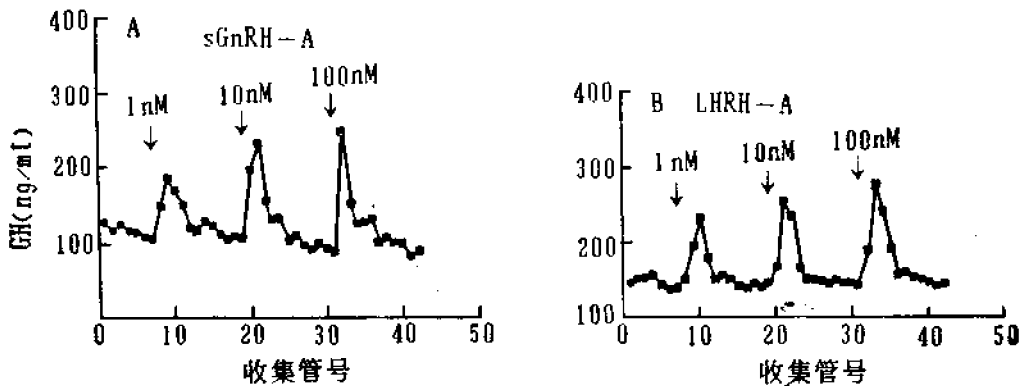


图3 离体灌注孵育的鲤鱼脑垂体对 2 分钟脉冲式 sGnRH-A(A)和 LHRH-A(B)刺激 (箭头表示)的 GH 分泌反应过程(显示一个代表性的灌注结果)

Fig. 3 Patterns of GH release from perfused pituitary of common carp in response to 2-min pulses (arrow) of three doses of sGnRH-A(A) and LHRH-A (B) (in a representative column)

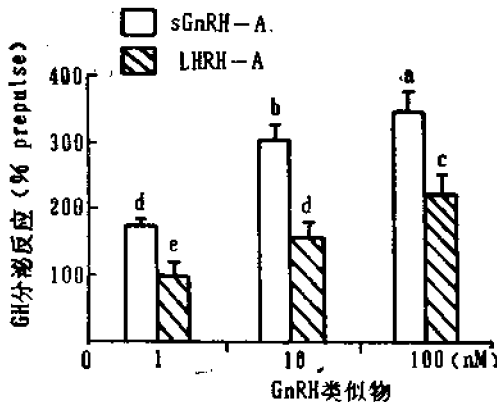


图4 三种剂量脉冲式 LHRH-A 和 sGnRH-A 刺激离体灌注孵育的鲤鱼脑垂体 GH 分泌作用的比较(图中平均值上的不同字母表示有显著差异)

Fig. 4 Comparison of GH release from perfused pituitary of common carp in response to 2-min pulses of three doses of sGnRH-A and LHRH-A (different letters above each mean indicating significant difference)

三、讨 论

本结果表明 sGnRH-A 和 LHRH-A 直接刺激鲤鱼离体脑垂体 GH 分泌。GnRH 刺激鱼类脑垂体 GH 分泌作用最早是在金鱼中报道 [Chang 等, 1990; Marchant 等, 1989]。最近,在鲤鱼离体研究中,我们已证明 sGnRH、鸡 GnRH-II 以及 LHRH 都能在生理剂量范围内不同程度地刺激离体鲤鱼脑垂体 GH 和促性腺激素(GtH)分泌,同时发现 sGnRH-A 有较高的离体 GH 和 GtH 释放效力[Lin 等, 1993]。在许多硬骨鱼类中, sGnRH-A 已被证明是刺激脑垂体 GtH 分泌的最高效类似物之一 [Crim 等, 1988; Habibi 等, 1989; Peter 等, 1985]。本结果中 sGnRH-A 刺激离体 GH 分泌活性显著高于 LHRH-A。进一步证明了 GnRH 刺激鱼类 GtH 分泌作用的结构功能关系在刺激 GH 分泌中同样存在。

金鱼在体实验结果证明,体内注射 sGnRH、LHRH 及其类似物都能显著提高血清 GH 水平,且 GnRH 类似物的作用能持续较长的时间 [Marchant 等, 1989]。在本实验中,最后一次注射 LHRH-A 或 sGnRH-A 一周后,草鱼鱼种血清 GH 水平仍有一定的增加,但不显著。这可能是由于 GnRH 类似物作用的持续时间已过,血清 GH 水平开始下降后的结果。注射高剂量 LHRH-A 一周后血清 GH 水平的增加是显著的,表明两种类似物在体内对酶分解的抗性不同,导致其作用的持续时间不同。

鱼类 GH 与生长的密切相关关系已被证明 [Lin 等, 1989; Marchant 等, 1986] 体内注射高剂量 ($0.1\mu\text{g/g}$ 体重) LHRH-A 可显著促进金鱼体长的生长 [Marchant 等, 1989]。本研究中两种剂量 LHRH-A 或 sGnRH-A 都能显著促进草鱼鱼种体重和体长的生长,其作用是剂量依存的,并且 sGnRH-A 的促生长作用显著高于 LHRH-A。这与离体实验中 sGnRH-A 促进 GH 分泌的高活性结果相一致,推测 sGnRH-A 在体内促进 GH 合成分泌的生物活性较高,从而产生较高的促生长作用。由于 GnRH 类似物刺激血清 GH 水平升高的持续时间较短 [Marchant 等, 1989],故最后一次注射后一周的血样中 GH 水平不能确切反映出 GnRH 在体内对 GH 合成分泌的调节作用。GnRH 肽促进养殖鱼类生长作用的机理和在鱼类养殖中的应用尚待进一步研究。

国家自然科学基金和高校博士点专项科研基金资助课题。

参 考 文 献

- [1] Billard, R. 1989. Endocrinology and fish culture. *Fish Physiol. Biochem.*, 7: 49-53.
- [2] Chang, J. P. et al., 1990. Use of a pituitary cell dispersion method and primary culture system for studies of gonadotropin-releasing hormone actions in the goldfish, *Carassius auratus*. I. initial morphological, static, and cell column perfusion studies. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 77: 256-273.
- [3] Crim, L. W. et al., 1988. Studies on the biological activity of LHRH analogs in the rainbow trout,

- landlocked salmon, and winter flounder. *Ibid*, 71: 372—382.
- [4] Donaldson, E. M. *et al.*, 1979. Hormonal enhancement of growth in fish. In *Fish Physiology*, Vol. III. W. S. Hoar *et al.* eds. pp.455—597. Academic Press, London.
- [5] Habibi, H. R. *et al.*, 1989. Functional relationship between receptor binding and biological activity for analogs of mammalian and salmon gonadotropin-releasing hormone in the pituitary of goldfish (*Carassius auratus*). *Biol. Reprod.*, 40: 1152—1161.
- [6] Lin, H. R. *et al.*, 1989. Studies on growth rates and serum growth hormone levels in grass carp. In *Hormones and the Environment, Proceedings of An International Symposium* held at University of Hong Kong. D. K. O. Chan ed. pp.117—118. University of Hong Kong.
- [7] Lin, X. W. *et al.*, 1993. Growth hormone and gonadotropin secretion in the common carp (*Carassius carpio* L.): *in vitro* interactions of gonadotropin-releasing hormone, somatostatin and the dopamine agonist apomorphine. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 89: 62—71.
- [8] Marchant, T. A. *et al.*, 1986. The relationship between circulating growth hormone levels and somatic growth in a teleost species, *Carassius auratus* L., In *Aquaculture of Cyprinids*. R. Billard and J. Marcel eds. pp.43—54. INRA, Paris.
- [9] ———, 1989. Evidence that gonadotropin-releasing hormone also functions as a growth hormone-releasing factor in the goldfish. *Endocrinology*, 124: 2509—2518.
- [10] Peter, R. E. *et al.*, 1985. Structure-activity relationships of mammalian, chicken, and salmon gonadotropin-releasing hormones *in vivo* in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 58: 231—242.
- [11] Ricker, W. E. 1979. Growth rates and models. In *Fish Physiology*, Vol. II. W. S. Hoar *et al.* eds. pp.677—743. Academic Press, New York.
- [12] Zohar, Y. 1989. Endocrinology and fish farming: aspects in reproduction, growth, and smoltification. *Fish Physiol. Biochem.*, 7: 395—405.

GROWTH HORMONE SECRETION AND GROWTH OF CULTURED FISH INDUCED BY GONADOTROPIN- RELEASING HORMONE ANALOGS

Lin Xinwei and Lin Haoran

(Department of Biology, Zhonshang University, Guangzhou 510275)

Zhang Qing

(South China Sea Fisheries Research Institute, Guangzhou 510300)

ABSTRACT The directly stimulating actions of salmon GnRH analog sGnRH-A (Arg⁴Trp⁷Leu⁹Pro¹⁰NEt-LHRH) and mammalian GnRH analog LHRH-A (Ala¹Pro²NEt-LHRH) on growth hormone (GH) secretion from pituitary of common carp (*Cyprinus carpio* L.), and the effects of LHRH-A and sGnRH-A on serum GH levels and growth of grass carp fingerling were studied by using an *in vitro* perfusion system and *in vivo* treatment respectively. Two-min pulses of sGnRH-A or LHRH-A (1, 10 and 100nM), in dose-dependent manner, directly stimulated GH secretion from perfused pituitary fragments of common carp. The *in vitro* GH-releasing potency of each dose of sGnRH-A was significantly higher than that of the same dose of LHRH-A. Intraperitoneal injection of sGnRH-A or

LHRH-A(0.01 μ g/g, b.w./week and 0.001 μ g/g, b.w./week, once a week, total of six weeks) resulted in significant increase in relative somatic growth rate (RSGR) and relative linear growth rate (RLGR) and in increase in serum GH levels of grass carp fingerling. The inductions of LHRH-A and sGnRH-A on growth of grass carp fingerling were dose-dependent, and the increases in RSGR and RLGR induced by sGnRH-A were significantly higher than those induced by LHRH-A. These results indicated that GnRH analog can directly stimulate GH secretion from pituitary and induce increase in growth rate of cultured fish. The relationships between structure and function of GnRH analog in inducing GH secretion and growth are similar to those in stimulating gonadotropin secretion in teleost.

KEYWORDS GnRH, growth hormone, growth, common carp, grass carp

欢迎订阅《中国科协报》

《中国科协报》是中国科学技术协会主管和主办的报纸，江泽民总书记题写了报名。《中国科协报》是中国科协指导工作、交流经验、研讨政策、传播信息、反映科技人员的意愿的新闻媒介，其宗旨是：发挥全国各级科技群众团体的优势，依靠广大会员和科技工作者，宣传“科学技术是第一生产力”的重要思想，宣传尊重知识、尊重人才的社会风尚，宣传科技社会团体的功能和作用，促进科学技术的繁荣和发展，促进科学技术的普及和推广，促进科学技术人才的成长和提高，为经济振兴、科技进步和社会发展作出贡献。

《中国科协报》的读者对象是：各级科协和学会（协会、研究会）干部和从事科普工作的人员，各级各类学会会员，各个领域从事科研、生产的科技人员和管理人员，高等和中等学校师生，一切关心科技事业发展和科协工作的党政领导干部、行政管理干部和社会各界人士。

《中国科协报》对开四版，采用计算机激光照排和胶版印刷，每周四出版。全国公开发行，国内邮发代号1—179，读者可及时到当地邮局订阅。如在当地邮局订阅有困难，请直接汇款至本社经理部。本报月价1.08，季价3.24，全年12.96。另请加订报款的15%为邮费。

本社地址：北京市海淀区学院南路86号

联系人：冷艳玲

邮 编：100081

电 话：8318877—496