

文章编号:1000-0615(2001)05-0393-05

促黄体素释放激素和多巴胺拮抗物对 鲇促性腺激素释放的作用

温海深, 林浩然

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要:以珠江流域鲇为研究对象,分别在性腺发育早期、性腺发育晚期、性腺发育成熟与产卵前期、性腺退化期注射促黄体素释放激素类似物和多巴胺 D₂ 受体拮抗物,处理后 6h、12h、24h 测定血液中的促性腺激素水平变化。结果表明,在性腺发育的各个时期,促黄体素释放激素类似物和多巴胺 D₂ 受体拮抗物联合注射能显著刺激鲇促性腺激素分泌;鲇脑垂体促性腺激素的分泌受下丘脑释放的促性腺激素释放激素和多巴胺的双重调节,多巴胺只能抑制促性腺激素释放激素诱导的促性腺激素分泌。在建立鲇人工繁殖技术时,可采用促黄体素释放激素类似物和多巴胺 D₂ 受体拮抗物联合注射方法。

关键词:鲇;促性腺激素;促黄体素释放激素类似物;多巴胺受体拮抗物

中图分类号:Q579.1;S917 **文献标识码:**A

Effect of LHRH-A and domperidone on gonadotropin releasing in *Silurus asotus*

WEN Hai-shen, LIN Hao-ran

(School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: To catfish (*Silurus asotus*) of Pearl River, in the stage of early gonadal development, the stage of late gonadal development, mature and preovulatory stage, and the sexually regressed stage, luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRH-A) and dopamine antagonist, domperidone (DOM) were injected, and then GtH levels of serum were sampled and assayed using the radioimmunoassay after 6h, 12h and 24h. The results indicated that it could enhance significantly GtH levels of serum by injection of LHRH-A plus DOM in every gonadal periods; GtH secretion in catfish was under a dual control of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and dopamine (DA) released from the hypothalamus, and DA could only inhibit GtH induced by GnRH from releasing; the combination of LHRH-A and DOM could be used to induce ovulation in catfish.

Key words: *Silurus asotus*; gonadotropin; luteinizing hormone-releasing hormone analogue; dopamine antagonist

随着我国名优特新水产养殖业的蓬勃发展,鲇 (*Silurus asotus*) 已被列为地方优质鱼类,关于其生物学和人工繁殖技术的探讨日益增多^[1-4]。研究表明,鲇形目 (Siluriformes) 中的胡子鲇科 (Clariidae) 和鲢科 (Bagridae) 鱼类促性腺激素 (GtH) 分泌的神经内分泌调节机制与鲤科 (Cyprinidae) 鱼类在某些方面有一定的差异。在鲤科鱼类中,多巴胺 (DA) 拮抗物既能刺激基础的 GtH 分泌,又能刺激促性腺激素释放激

收稿日期:2000-04-21

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970586)

第一作者:温海深(1963-),男,内蒙古通辽人,副教授,博士研究生,主要从事鱼类生理学研究。E-mail:whs106@163.net

素(GnRH)诱导的 GtH 分泌^[5-8],而在大鳍鲢(*Hemibagrus macropterus*),多巴胺只能抑制 GnRH 诱导的 GtH 释放^[9]。鲇科(Siluridae)鱼类是鲇形目中起源和分布都较特殊的类群,其生殖生态学具有较大的可塑性,诸如分布广泛、种群数量较大、对温度的耐受能力强、对产卵基质的要求不严等。关于鲇生殖内分泌的研究在国内外尚未见报道。本文以珠江流域鲇为研究对象,从理论上阐述鲇 GtH 分泌的神经内分泌调节机制,并为其人工繁殖技术的建立提供理论依据。

1 材料与方方法

1.1 实验材料

实验鲇取自珠江流域天然水体,依性腺发育状况将其划分成四个时期:

表 1 鲇性腺发育分期

Tab.1 Development stages of gonad in *S. asotus*

性腺分期	发育早期	发育晚期	成熟与产卵前期	退化期
时间范围	1998-12~1999-01	1999-03~1999-04	1999-06~1999-07	1999-10
雌性成熟系数	1.52%~5.53%	4.32%~34.4%	2.80%~17.97%	3.05%~12.0%
雄性成熟系数	0.92%~2.30%	0.6%~1.75%	0.56%~2.55%	0.31%~1.22%

1.2 实验设计

将每个性腺发育期的鱼类分成四组,每组 8~10 尾鱼,其中性腺发育早期和退化期实验未分雌雄鱼。I 组:单独注射淡水鱼类生理盐水(P.S);II 组:单独注射(Domperidone, DOM,多巴胺 Ω_2 受体拮抗剂),为比利时 Janssen 公司产品,注射剂量为每 kg 体重 5mg;III 组:单独注射促黄体素释放激素类似物(des Gly¹⁰[D-Ala⁶] LHRH ethylamide, LHRH-A),宁波激素厂产品,注射剂量为每 kg 体重 50 μ g;IV 组:联合注射 LHRH-A 和 DOM。每组注射 6h, 12h, 24h 后,用 1mL 注射器从尾静脉取血液,在 -4 $^{\circ}$ C 静止 4~6h,然后高速离心 5~8min(15 000 r \cdot min⁻¹)分离血清,在 -20 $^{\circ}$ C 贮存待测 GtH。

1.3 GtH 的放射免疫测定方法(RIA)

采用异源 GtH RIA,即鲤双抗体放射免疫测定法^[10],以鲤促性腺激素(cGtH-II)为标记抗原和标准品,第一抗体为兔抗鲤 cGtH- β 亚基抗血清(β -Sunbint cGtH),第二抗体为羊抗兔 γ -球蛋白血清(GAR,美国 Amel 公司产品)。采用本实验室建立的 cGtH¹²⁵I 标记法(氯胺 T 法)标记^[11]。

1.4 标准曲线和样品稀释曲线的建立

按每 50 μ L 稀释液中含有 100、50、25、20、10、5、2.5、1.25、0.64、0.32、0.16ng cGtH 标准品制成浓度梯度,以便建立标准曲线;另取 GtH 含量较高的血清样品 100、50、25、12.5 μ L 体积以便得到样品稀释曲线。取 50 μ L 上述样品分别加入 200 μ L 兔抗鲤 cGtH- β 亚基抗血清(稀释度为 1:220 000),第二天加入 200 μ L 的 cGtH¹²⁵I (15 000 cpm/200 μ L),第三天加入 200 μ L GAR(1:20),第四天进行冷冻离心 30min (2 000g),弃去上清液在 COBRA II AUTO GAMMA 计数上测 cpm(1min)。以上操作均在 -4 $^{\circ}$ C 下进行。以稀释度为横坐标,以 B/B₀为纵坐标做标准曲线和样品稀释曲线(图 1)。

1.5 数据处理

实验所得资料均表示为平均数 \pm 标准差($X\pm SE$),采用 Duncan 氏新复极差检验各组间 GtH 水平差异显著性。

2 实验结果

2.1 鲇血清 GtH 与 cGtH 的交叉免疫反应

鲇血清对 cGtH 的竞争曲线与 cGtH 的标准曲线相平行,结果见图 1。

2.2 性腺发育早期鲈血清 GtH 水平对注射 LHRH-A 和(或)DOM 的反应

在水温为 20℃时,单独注射 DOM 不能显著刺激雌雄鲈血清 GtH 水平升高,单独注射 LHRH-A 能使血清 GtH 水平有一定程度提高,而 LHRH-A 和 DOM 联合注射时,处理后 12h 血清 GtH 水平开始上升并达到峰值(图 2)。

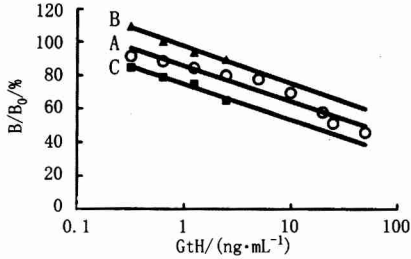


图 1 鲤 cGtH 标准曲线(A)与鲈血清对 cGtH 的竞争抑制曲线(B)

Fig.1 Dose-response inhibition curves for carp gonadotropin(A) and serial dilutions of serum from *S. asotus* (B)

注:横坐标和纵坐标经过了对数转换。

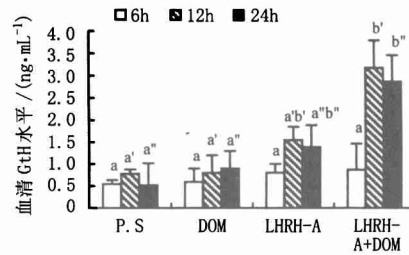


图 2 注射 LHRH-A/DOM 对性腺发育早期鲈血清 GtH 水平的影响

Fig.2 Effects of LHRH-A alone and in combination with DOM on serum GtH levels of *S. asotus* in the stage of early gonadal development

注:图中标有相同字母者表示水平 GtH 无显著差异。

2.3 性腺发育晚期鲈血清 GtH 水平对注射 LHRH-A 和(或)DOM 的反应

水温为 25℃时,单独注射 DOM 不能使雌性鲈血清 GtH 水平显著升高,单独注射 LHRH-A 能使血清 GtH 水平略有提高,而 LHRH-A 和 DOM 联合注射时,血清 GtH 水平在处理 12h 即达到峰值。单独注射 DOM 不能刺激雄性鲈 GtH 释放,而单独注射 LHRH-A 或 LHRH-A 与 DOM 联合注射,均能显著刺激脑垂体 GtH 释放,两种情况下 GtH 在处理 12h 达到峰值,但 GtH 对 LHRH-A 和 DOM 联合注射反应更敏感(图 3)。

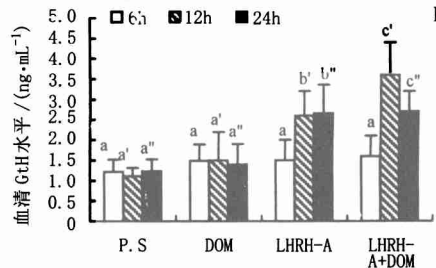
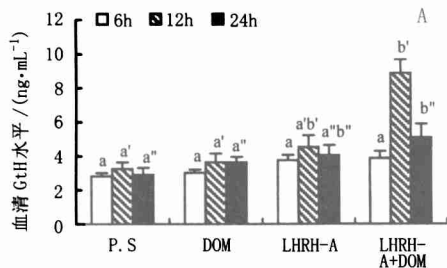


图 3 注射 LHRH-A/DOM 对性腺发育晚期鲈血清 GtH 水平的影响

Fig.3 Effects of LHRH-A alone and in combination with DOM on serum GtH levels of *S. asotus* in the stage of late gonadal development

注:(1)A 为雌性; B 为雄性;(2)图中标有相同字母者表示水平 GtH 无显著差异

2.4 性腺成熟期或产卵期鲈血清 GtH 水平对注射 LHRH-A 和(或)DOM 的反应

在水温为 30℃时,单独注射 DOM 均不能显著刺激雌性鲈血清 GtH 水平升高,单独注射 LHRH-A 能使血清 GtH 水平略有提高,而当 LHRH-A 和 DOM 联合注射时能显著刺激 GtH 释放,并且在处理后 6h 即达到峰值。单独注射 LHRH-A 或 LHRH-A 和 DOM 联合注射时,都能显著刺激雄性鲈 GtH 释放,但 GtH 对 LHRH-A 和 DOM 联合注射反应更敏感,在处理 6h 即达到峰值(图 4)。

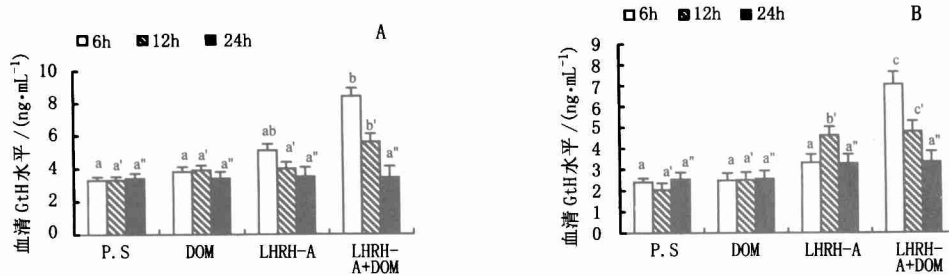


图4 注射 LHRH-A/DOM 对性腺发育成熟与产卵前期鲇血清 GtH 水平的影响

Fig.4 Effects of LHRH-A alone and in combination with DOM on serum GtH levels of *S. asotus* in mature and preovulatory stage

注:(1)A 为雌性; B 为雄性;(2)图中标有相同字母者表示水平 GtH 无显著差异

2.5 性腺退化期鲇对注射 LHRH-A 和(或 DOM)的反应

在水温为 25℃时,单独注射 DOM 不能显著刺激雌雄鲇血清 GtH 水平升高,单独注射 LHRH-A 能使血清 GtH 水平略有提高,而 LHRH-A 与 DOM 联合注射则能显著刺激 GtH 释放,处理后 12h GtH 水平达到峰值(图 5)。

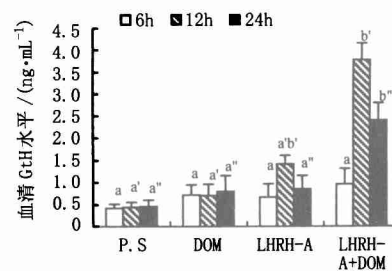


图5 注射 LHRH-A/DOM 对性腺退化期鲇血清 GtH 水平的影响

Fig.5 Effects of LHRH-A alone and in combination with DOM on serum GtH levels of *S. asotus* in sexually regressed stage

注:图中标有相同字母者表示水平 GtH 无显著差异。

3 讨论

3.1 采用 cGtH-β 亚基抗血清的 RIA 测定鲇血清水平的可行性

研究采用 cGtH-β 亚基抗血清 RIA 测定了鲇血清 GtH 水平,从图 1 可知样品的稀释曲线与标准曲线平行,并且通过测定血清 GtH 水平对注射 LHRH-A 和 DOM 反应的季节性变化,以及人工诱导鲇排精和排卵过程中 GtH 水平变化,这些结果都较好地反应了鲇 GtH 的分泌释放规律及其与性腺发育成熟和排卵的关系,证明该方法可以用于鲇 GtH 的测定。Dufour 等^[12]首先建立 cGtH-β 亚基抗血清 RIA,并将其作为异源 RIA 测定欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)的 GtH 含量,此后在日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)^[10],非洲胡子鲇(*Clarias gariepinus*)和鲢科鱼类中应用都取得了成功^[9,13]。由于这种方法的种间特异性不强,可适用于多种亲缘关系较远的鱼类,因而和非洲胡子鲇同源放射免疫测定方法(cfGtH RIA),采用鲤 GtH 放射免疫测定方法(cGtH RIA)具有较广泛的适用性^[11,13]。

3.2 注射 LHRH-A 和 DOM 对不同性腺发育期鲇血清 GtH 水平的影响

由图 2~5 可知在性腺发育的各个时期,单独注射 DOM 不能使雌性鲇血清 GtH 水平显著提高,而单独注射 LHRH-A 能促使雌性鲇血清 GtH 水平有一定程度升高,但受水温和性腺发育状况的影响,不同季节鲇血清 GtH 对 LHRH-A 的反应敏感性不同;但当两者联合注射时,雌雄鲇血清 GtH 水平均明显提高,与其它处理相比有显著差异。这说明鲇 GtH 分泌一方面受下丘脑释放的促性腺激素释放激素(GnRH)的刺激,同时又受多巴胺(DA)的抑制。由于 DA 的拮抗物 DOM 不能促进基础的 GtH 分泌,表明 DA 只能抑制 GnRH 诱导的 GtH 分泌。这一研究结果与鲤科鱼类有所不同^[5,8],而与非洲胡子鲇和大鳍鱮(*Hemibagrus macropterus*)相似^[9,14],这可能是由于鲇科鱼类在进化上与鲤科鱼类存在较大的差异,导致它们采取的生殖内分泌调节机制出现不同特性。值得强调的是,在不同的性腺发育期,血清 GtH 水平有差异,它们对 LHRH-A/DOM 的敏感程度也不一样。由图 3 和图 4 可以看出,就雌性鲇而言,其敏感

性顺序为:性腺发育晚期>性腺成熟与产卵前期>性腺发育早期>性腺退化期,这一结果与鲤科鱼类相似^[15],而与鲮科不同^[9]。现已证明,在鲤科和鲮科鱼类中,血清中基础的 GtH 水平随着生殖周期的不同而呈现明显的季节性变化^[16],这可能和 GtH 细胞受体的季节性变化有关,正是这种季节性差别使其对外源激素的敏感程度不同。但研究结果表明,雄鲢 GtH 细胞对 LHRH-A/DOM 的反应较雌鱼敏锐,季节性变动也较小。

3.3 LHRH-A 和 DOM 联合注射后温度对鲢血清 GtH 水平的影响

由图 2~图 5 可知,不同的季节注射 LHRH-A + DOM 后,鲢血清中 GtH 水平达到高峰的时间和维持的时间也不同,基本规律是:随着水温的升高,血清 GtH 峰值出现早,维持时间短。在水温较低的季节[性腺发育早期,水温为(20±1)℃],处理后 22~24h GtH 水平才达到峰值,而在水温较高的季节[性腺成熟和产卵期,水温为(30±1)℃],血清 GtH 水平在处理 6~8h 就出现了峰值,但维持的时间也较短,12h 后已恢复到最初的水平。这是因为水温与性腺发育的进程是一致的,高温季节鲢血液中的 GtH 基础水平也较高,对 LHRH-A + DOM 也较敏感,处理后血清 GtH 水平上升幅度较大,而 GtH 在血液中的清除率也高,因而维持时间短,这一点与其它硬骨鱼类是相似的。

3.4 关于鲢人工繁殖技术的建立

鲢 GtH 释放的神经内分泌调节机制与鲤科鱼类有所不同,而与鲢形目中的胡子鲢科和鲮科鱼类相似,均可以通过联合注射 LHRH-A 和 DOM 的方法达到人工诱导排卵的目的,而为了使操作更为简单,雄性鲢也可单独注射 LHRH-A。

参考文献:

- [1] 潘伟志,郭佳祥,田丰声,等. 鲢的人工繁殖[J]. 水产学报,1992,16(3):278-281.
- [2] 魏刚,黄林. 鲢繁殖生物学研究[J]. 水产学报,1997,21(3):225-232.
- [3] 温海深,曹克驹. 辽河鲢个体生殖力研究[J]. 华中农业大学学报,1997,25(增刊):1-5.
- [4] 刘焕亮,蒲红宇,胡作文,等. 鲢人工繁殖关键技术的研究[J]. 大连水产学院学报,1998,13(2):1-8.
- [5] Sokolowska M, Peter R E, Nahomiak G S, et al. Seasonal effects of pimoide and des Gly¹⁰[D-Ala⁶] LHRH ethylamide on gonadotropin secretion goldfish[J]. Gen Comp Endocrinol, 1985,57:472-479.
- [6] Lin H R, Van Der Kraak G, Liang J Y, et al. The Effects of LHRH analogue and drugs which block the effect of domperidone on gonadotropin secretion and ovulation in fish cultured in China[A]. Aquaculture of Cyprinids[C]. Paris:INRA Service des publication, 1986.
- [7] 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 pimoide or domperidone, on gonadotropin release and ovulation in the Chinese loach carp[J]. Gen Comp Endocrinol, 1988,69:31-40.
- [8] Lin H R, Wany L. Dopaminergic regulation of gonadotropin and growth hormone secretion in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [A]. In proceeding of the international symposium of biotechnology application in aquaculture[C]. Beijing: Asian Fisheries Society Special publication, 1995.
- [9] 王德寿,林浩然,Th H J 谷斯. 大鳍鲮促性腺激素分泌调控的研究[J]. 动物学报,1998,44(3):322-328.
- [10] 林浩然,张梅丽,张素敏,等. 鳊繁殖生物学研究IV. 人工催熟过程中下海鳊的 GtH 分泌活动、性腺发育状况和脑垂体的超微结构[J]. 水生生物学报,1987,11(4):320-328.
- [11] Peter R E, Nahomiak C S, Chang J P, et al. Gonadotropin release from the pars distalis of goldfish, *Carassius auratus*, transplanted beside the brain or into the brain ventricles: Additional evidence for gonadotropin release-inhibitory factor[J]. Gen Comp Endocrinol, 1984,55:337-346.
- [12] Dufour S, Belle N D L, Fontaine Y A. Development of a heterologous radioimmunoassay for eel (*Anguilla anguilla*) gonadotropin[J]. Gen Comp Endocrinol, 1983,49:404-413.
- [13] Goos H J Th, De Leeuw L, Burawa-Gevard E, et al. Purification of gonadotropin hormone from the pituitary of the African catfish, *Clarias gariepinus*, and the development of a homomogous radioimmunoassay[J]. Gen Comp Endocrinol, 1986,63:162-170.
- [14] De Leeuw R, Resink J W, Rooyackers E J M, et al. Pimoide modulates the luteinizing hormone-releasing hormone effect on gonadotropin release in the African catfish, *Clarias lazera*[J]. Gen Comp Endocrinol, 1985,58:120-127.
- [15] 王黎,林浩然,林信伟. 多巴胺能药物对鲤鱼促性腺激素分泌活动的影响[J]. 动物学报,1997,43(1):74-79.
- [16] Peter R E. Gonadotropin secretion during reproduction cycles in teleosts: Influences of environmental factors[J]. Gen Comp Endocrinol, 1981,45:294-305.