

17 β -雌二醇和甲基睾酮对离体长臀鲢脑垂体促性腺激素分泌的影响

周立斌^{1,2}, 刘晓春¹, 叶卫³, 林浩然¹

(1. 中山大学水生经济动物研究所, 广东广州 510275; 2. 惠州学院生命科学系, 广东惠州 516007; 3. 番禺国家级罗非鱼良种场, 广东广州 511453)

摘要:性类固醇激素对性腺发育期间的鱼类促性腺激素(GTH)分泌有负反馈作用,而对性未成熟的鱼类GTH分泌有正反馈作用。本实验选取性腺发育中期的长臀鲢(*Cranoglanis boudierus*)进行研究,将实验用鱼分成4组(实验重复3次,每组共用6尾鱼):①持续性17 β -雌二醇(17 β -Estradiol, E₂)处理;②E₂在注入促性腺激素释放激素类似物(Analogue of gonadotropin-releasing hormone, GnRH-A)脉冲刺激的处理;③持续性甲基睾酮(17 α -methyltestosterone, MT)处理;④MT在注入GnRH-A脉冲刺激的处理;采用离体灌流孵育和GTH放射免疫测定的方法研究E₂和MT对长臀鲢脑垂体GTH分泌的影响。持续性的E₂(1 μ mol/L)处理能显著性地抑制长臀鲢脑垂体碎片基础GTH的分泌,而持续性的MT(1 μ mol/L)处理能抑制长臀鲢脑垂体碎片基础GTH的分泌,同时E₂和MT处理能抑制GnRH-A刺激的GTH分泌,而高浓度的E₂和MT处理(10 μ mol/L)要比低浓度的E₂和MT处理(0.1 μ mol/L)对长臀鲢脑垂体碎片基础GTH释放抑制能力强。这些结果表明,在离体实验中,E₂和MT对性腺发育中期的长臀鲢脑垂体的GTH的分泌具有负反馈的作用,并且可能直接参与了长臀鲢脑垂体的GTH调节。

关键词:长臀鲢;17 β -雌二醇和甲基睾酮;促性腺激素;灌流孵育

中图分类号:Q959.483 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)02-0113-06

性类固醇激素对GTH细胞的分泌有正和负的反馈作用。一般说来,在鱼类性腺发育期间(这里指已成熟的鱼类再一次性腺发育期间),性类固醇激素对GTH的分泌有负反馈作用,在产卵期间尤为明显。而在性未成熟的鱼类中,性类固醇激素对GTH分泌有正反馈作用^[1],而性类固醇激素对GTH分泌调控机制有3种可能的模式:直接作用于脑垂体;或者通过对下丘脑的影响而间接产生作用;抑或是两者兼有。

鲴形目(Siluriformes)鱼类在世界养殖鱼类中占有重要的位置。长臀鲢(*Cranoglanis boudierus*)属鲴形目,是该目中我国特有的名贵经济鱼类,属于长臀鲢科(Cranoglanididae),长臀鲢属(*Cranoglanis*),具有重要的开发利用价值。本研究采用离体实验的方法,对长臀鲢脑垂体碎片进行灌流孵育,以便了解不同时间的17 β -雌二醇(E₂)和甲基睾酮(MT)刺激对长臀鲢脑垂体细胞GTH分泌的影响,以及在

E₂和MT的影响下长臀鲢脑垂体碎片对促性腺激素释放激素类似物(GnRH-A)的应答,旨在为长臀鲢的人工繁殖提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

长臀鲢购于广州黄沙水产品批发市场。为性腺发育中期的鱼,体长30~34 cm,体重520~720 g,实验时不分雌雄。

1.2 试剂

E₂和MT(Sigma公司产品),GnRH-A(宁波激素厂产品)。

1.3 长臀鲢脑垂体碎片的离体灌流孵育

垂体离体灌流实验采用本实验室建立的方法^[2]。将实验鱼断头取血,立即取出垂体置于冰浴的平衡盐溶液(含25 mmol/L HEPES和0.1%牛血清白蛋白,简称HBSS)中清洗,然后将脑垂体切成小于1 mm³碎

收稿日期:2004-06-17; 修订日期:2004-06-17。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970586);广东省自然科学基金(博士启动)资助项目(04300587);广东海洋渔业局淡水鱼类繁育中心资助项目。

作者简介:周立斌(1972-),男,博士,从事鱼类生理学和分子生物学工作。E-mail: zlb@hnu.edu.cn

通讯作者:林浩然。E-mail: lx32@zsu.edu.cn

片。清洗碎片多次后,将每份相当于半个脑垂体的碎片分别转移到0.3 mL柱状灌流孵育室中,并置于两层Cytodex-III微载体之间。用M199培养液(含Hanks盐溶液、25 mmol/L HEPES和15 μ g/mL制霉菌素)预灌流过夜(8~10 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,继续预灌流2 h,以建立稳定的激素基础分泌,灌流温度为 $(19\pm 1)^\circ\text{C}$ 。实验时,根据不同的实验设计给予刺激,用自动收集器每5 min(脉冲式刺激)或10 min(持续性刺激)收集1管灌流液样品,贮存于 -25°C 的低温冰箱中待测GTH。

1.4 实验设计

1.4.1 持续性 E_2 刺激对长臀鲢脑垂体碎片GTH细胞分泌GTH的影响 长臀鲢脑垂体碎片在预灌流后,先收集6管作为GTH细胞的基础分泌值,然后再注入1 $\mu\text{mol/L}$ 的 E_2 持续性刺激,每10 min收集1管,连续收集5 h,实验重复3次,共用6尾鱼。

1.4.2 E_2 对GnRH-A脉冲刺激促进的长臀鲢离体脑垂体碎片GTH细胞分泌GTH的影响 预灌流液M199和HBSS中分别加入0.1 $\mu\text{mol/L}$ E_2 和10 $\mu\text{mol/L}$ E_2 ,对照组不加,脑垂体碎片在预灌流后以1 h的间隔接受 $3\times 5\text{ min}$ 的GnRH-A脉冲式刺激,剂量为1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L,两次脉冲刺激之间的灌流液采用0.1 $\mu\text{mol/L}$ E_2 和10 $\mu\text{mol/L}$ E_2 2个浓度(对照组则不含 E_2),实验重复3次,共用6尾鱼。

1.4.3 持续性MT刺激对长臀鲢脑垂体碎片GTH细胞分泌GTH的影响 长臀鲢脑垂体碎片在预灌流后,先收集6管作为GTH的基础分泌值,再注入1 $\mu\text{mol/L}$ 的MT持续性刺激,每10 min收集1管,连续收集2 h,再引入1个5 min的GnRH-A刺激,然后再引入1 $\mu\text{mol/L}$ 的 E_2 持续性刺激,收集3 h,实验重复3次,共用6尾鱼。

1.4.4 MT对脉冲式GnRH-A脉冲刺激促进的长臀鲢离体脑垂体碎片GTH细胞分泌的影响 预灌流液M199和HBSS中分别加入0.1 $\mu\text{mol/L}$ MT和10 $\mu\text{mol/L}$ MT,对照组二者皆不加。脑垂体碎片在预灌流后以1 h的间隔接受 $3\times 5\text{ min}$ 的GnRH-A脉冲式刺激,剂量为1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L,两次脉冲刺激之间的灌流液采用0.1 $\mu\text{mol/L}$ MT和10 $\mu\text{mol/L}$ MT两个浓度(对照组则不含MT),实验重复3次,共用6尾鱼。

1.5 GTH RIA

采用本实验室建立的方法进行^[3]。

1.6 数据处理和计算

持续性刺激对脑垂体碎片GTH分泌率的计算参见文献[4],稍做修改,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内每1小时内各管(共6管)收集的各反应的激素含量平均值,再把此值转化为引入刺激前基础分泌值的百分数,即GTH分泌率(基础分泌的百分数/h), $\text{GTH分泌率}=(\text{激素含量平均值}/\text{基础分泌平均值})\times 100\%$ 。引入脉冲刺激的激素分泌反应值计算参见文献[2],稍做修改,把每个刺激之前的3管收集液的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,得到各自的刺激前的基础分泌的百分数(基础分泌的百分数),即 $\text{GTH分泌率}=[(n_1+n_2+n_3+n_4+n_5+n_6)-6\times \text{基础分泌值}]/\text{基础分泌值}\times 100\%$ 。用SPSS统计软件的Duncan's检验($P<0.05$)(多组之间)和Student's t 检验(两组之间)。

2 结果

2.1 持续性 E_2 刺激对长臀鲢脑垂体碎片基础GTH分泌的影响

长臀鲢脑垂体碎片经过10~12 h预灌流后,用1 $\mu\text{mol/L}$ E_2 对其进行5 h的持续性刺激。结果如图1所示,灌流后引入刺激的第1到第5小时,前2 h的基础GTH分泌率有降低,后3 h的基础GTH分泌率则显著降低,表明 E_2 对长臀鲢脑垂体碎片基础GTH的释放有抑制作用。

2.2 E_2 对注入GnRH-A脉冲刺激后离体脑垂体碎片GTH分泌的影响

长臀鲢脑垂体碎片离体灌流的3个灌流柱1个为对照组(不加任何药物),其他2个分别用0.1 $\mu\text{mol/L}$ 和10 $\mu\text{mol/L}$ E_2 的M199预灌流10~12 h,然后分别用0.1 $\mu\text{mol/L}$ 和10 $\mu\text{mol/L}$ E_2 HBSS对脑垂体碎片进行刺激,对照组依然不加药物,结果如图2所示,0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的 E_2 处理和10 $\mu\text{mol/L}$ 的 E_2 处理都使得GTH分泌率要比对照组低(其中10 $\mu\text{mol/L}$ 的 E_2 处理在注入10 nmol/L GnRH-A脉冲刺激后,GTH分泌率比对照组有显著降低),10 $\mu\text{mol/L}$ 的 E_2 处理也使GTH分泌率比0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的 E_2 处理低。

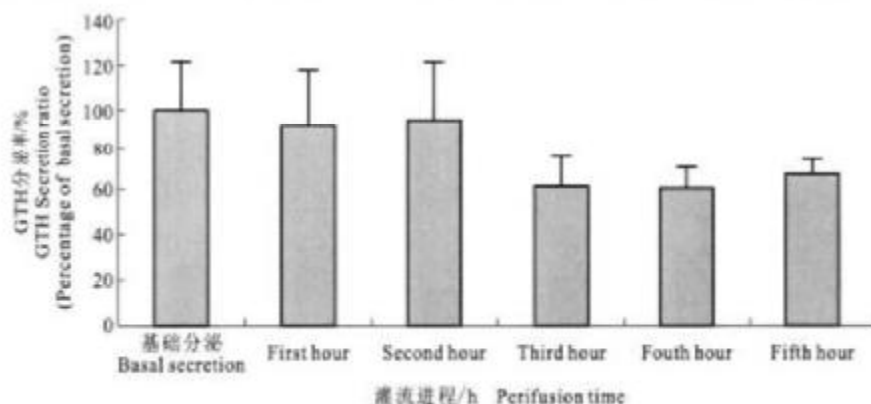


图1 持续性 E_2 对性腺发育中期长臀鲮离体脑垂体碎片GTH分泌的影响

注:图中值为 $\bar{X} \pm SE$,标有不同字母者表示差异性显著,Duncan's检验, $P < 0.05$ 。

Fig.1 Effect of chronic administration of E_2 on basal GTH releasing response from the pituitary fragments of helmet catfish at sexually mid-development stage

Note: The data in the figure shown as $\bar{X} \pm SE$. The significance was identified by the different superscript, by Duncan's test, $P < 0.05$.

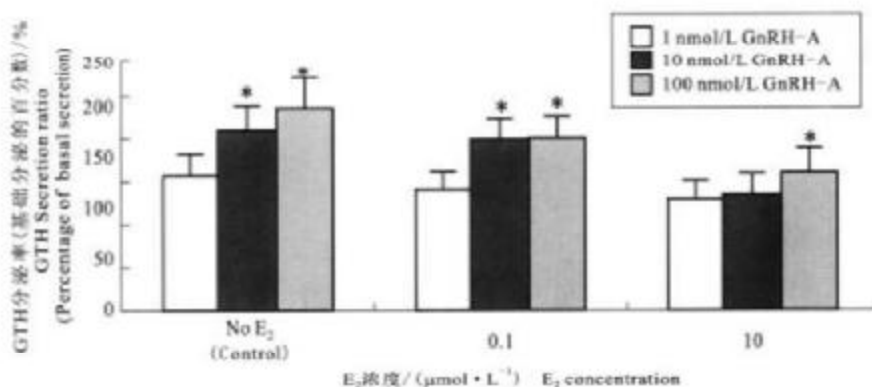


图2 不同浓度 E_2 对GnRH-A脉冲刺激的GTH分泌的影响

注:各值为3个重复灌流柱的 $\bar{X} \pm SE$,标有*表示与第一刺激相比差异显著,Student's t 检验, $P < 0.05$ 。

Fig.2 GTH releasing profiles in representative perfusion process after repetitive pulse administration of GnRH-A in different concentration of E_2

Note: Each value represents the $\bar{X} \pm SE$ of three replicate perfusion columns. The significance were identified by *, $P < 0.05$ by Student's t test.

2.3 持续性MT刺激对长臀鲮脑垂体碎片GTH分泌的影响

用 $1 \mu\text{mol/L}$ MT进行2 h的持续性刺激后,引入刺激的第1到第2小时内基础GTH分泌的百分数开始降低,2 h后,再引入1个5 min的 100 nmol/L 的GnRH-A刺激后,第1小时的基础GTH分泌率有所升高,后2 h则又开始下降(图3)。

2.4 MT对注入GnRH-A脉冲刺激后离体脑垂体碎片GTH分泌的影响

长臀鲮脑垂体碎片经过10~12 h分别含 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 和 $10 \mu\text{mol/L}$ MT的M199预灌流后,再分别用 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 和 $10 \mu\text{mol/L}$ 的MT对其进行刺激,结果如图4所示, $0.1 \mu\text{mol/L}$ 的MT处理和 $10 \mu\text{mol/L}$ 的MT处理都使得GTH分泌率比对照

组低(其中 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 和 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 E_2 处理在注入 10 nmol/L 和 100 nmol/L GnRH-A 脉冲刺激后, GTH 分泌率比对照组有显著降低), $10 \mu\text{mol/L}$

的 MT 处理也使 GTH 分泌率比 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 的 MT 处理低。

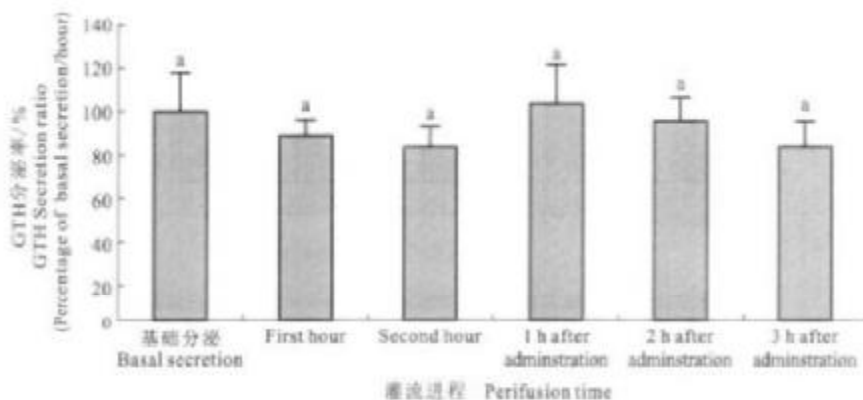


图3 持续性 MT 对性腺发育中期长臀鲶离体脑垂体碎片 GTH 分泌的影响

注:各值以 $\bar{X} \pm \text{SE}$ 表示,标有不同字母者表示差异性显著, Duncan's 检验, $P < 0.05$ 。

Fig. 3 Effects of chronic administration of MT on basal GTH releasing response from the pituitary fragments of helmet catfish at sexually mid-development stage

Note: Each value represents $\bar{X} \pm \text{SE}$; the significance was identified by different superscript, $P < 0.05$ by Duncan's test.

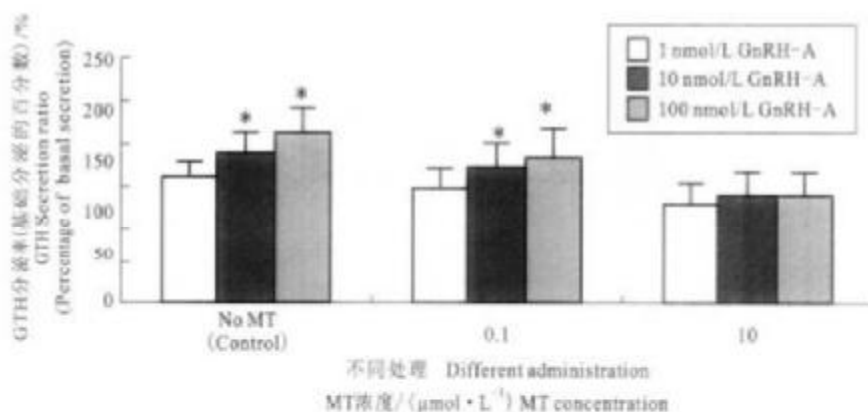


图4 不同浓度 MT 对 GnRH-A 脉冲刺激的 GTH 分泌的影响

注:各值为 3 个重复灌流柱的 $\bar{X} \pm \text{SE}$, 标有 * 表示与第 1 刺激相比差异显著, Student's t 检验, $P < 0.05$ 。

Fig. 4 GTH releasing profiles in representative perfusion process after repetitive pulse administration of GnRH-A in different concentration of MT

Note: Each value represents $\bar{X} \pm \text{SE}$ of three replicate perfusion columns; the significance were identified by *, $P < 0.05$ by Student's t test.

3 讨论

性类固醇激素对硬骨鱼类的 GTH 分泌有正和负反馈作用。在 1 龄大西洋鲑 (*Salmo salar*) 的脑

垂体和下丘脑外侧结节核埋植睾酮, 能使 GTH 在血液中的浓度和在脑垂体中的含量明显增加; 在未成熟虹鳟 (*Salmo gairdneri*), 埋植 GnRH 不影响血清 GTH 水平, 但与睾酮 (T) 同时埋植, 血清 GTH 水

平增加,表明 GnRH 对 GTH 释放刺激需要性类固醇激素的启动^[5];在幼鲢鱼(*Silurus asotus*),埋植 E_2 和 T 也能使脑垂体 GTH- II 含量增加^①。在未成熟鱼类中性类固醇激素对 GTH 释放的正反馈调节作用主要是通过增加脑垂体 GTH 的合成。在性成熟的硬骨鱼类中,性类固醇激素对 GTH 的释放却有正负两方面的反馈调节作用,对成熟金鱼(*Carassius auratus*)的研究表明,T 和 E_2 不影响基础 GTH 水平,但能增强离体^[6]GnRH 诱导 GTH 细胞的分泌;而在繁殖季节给成熟的雄鲤鱼注射睾酮,或者在脑垂体埋植 11-酮基睾酮,血液中很高的 GTH 水平就会降低下来^[1],这种负反馈作用的机理是当血液中的类固醇性激素(雌激素或雄激素)达到一定水平时就会和脑垂体与下丘脑的特异性受体结合,使 GTH 分泌降低。

本实验结果表明, E_2 能显著抑制性腺发育中期的长臀鲢脑垂体碎片基础 GTH 的分泌。当注入 $1\mu\text{mol/L}$ 的 E_2 刺激后,立即引起脑垂体碎片 GTH 释放的下降,两小时后,基础的 GTH 分泌的百分数则显著低于引入刺激前(图 1)。同样,引入 $1\mu\text{mol/L}$ 的 MT 刺激后,也引起了脑垂体碎片 GTH 释放的下降(图 3),这些结果和金鱼及鲢鱼种类相类似^[7-8]。对非洲鲈鱼的研究表明, E_2 的负反馈调节机制可能是通过影响 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)刺激的 GTH 分泌,包括影响垂体对 GABA 的反应性、GABA 受体数量、GABA 合成等^[6],在金鱼中, E_2 能降低脑 GABA 浓度,并阻断 GABA 对 GTH 分泌的刺激作用^[9]。但作者先前的研究表明,GABA 对离体的长臀鲢脑垂体的 GTH 分泌释放没有显著促进作用^[10],因此长臀鲢 E_2 的负反馈调节机制可能和金鱼的不同,至少不是通过影响 GABA 来完成的,有可能是通过其他负反馈作用机理来完成的,由于 E_2 在脑中经化儿茶酚胺 E_2 (Catecholmine E_2 , CE),CE 能与多巴胺(Dopamine, DA)竞争儿茶酚胺-O-甲基转移酶(Catechol-O-methyl-transferase, COMT),减弱了 DA 的降解,增强了 DA 对 GTH 分泌的抑制作用^[11],离体研究也证明了鲢鱼中 CE 和 DA 与 COMT 的竞争^[12]。此外,本实验中用含有 E_2 和 MT 孵育液对长臀鲢脑垂体碎片作用后,尤其是注入 3 个浓度的 GnRH-A 脉冲刺激后,可以看出,长臀鲢脑垂体碎片分泌的基础的和 GnRH-A 诱导的 GTH 有显著降低或降低,

推测在这个过程中, E_2 和 MT 可能直接参与了长臀鲢脑垂体 GTH 分泌活动的调节。

参考文献:

- [1] 林浩然. 鱼类生理学[M]. 广州:广东省高教出版社,1999. 181-196.
- [2] 林信伟,林浩然. 鲑鱼促性腺激素释放激素调节鲤鱼脑垂体生长激素分泌的离体研究[J]. 动物学报,1994,40(1):30-38.
- [3] 周立斌,刘晓春,林浩然,等. 长臀鲢脑垂体和血清中促性腺激素的生殖周期变化[J]. 动物学报,2003,49(3):399-403.
- [4] Hahibi H R, Marchant T A, Nahorniak C S, et al. Functional relationship between receptor binding and biological activity for analogs of mammalian and salmon gonadotropin-releasing hormones in the pituitary of goldfish (*Carassius auratus*) [J]. Biol Reprod, 1989, 40: 1152-1161.
- [5] Crim L W, Evans D W. Influence of testosterone and/or luteinizing hormone releasing hormone analogue on precocious sexual development in the juvenile rainbow trout [J]. Biol Reprod, 1983, 29: 137-142.
- [6] Trudeau V L, Somojai G M, Nahorniak C S, et al. Interactions of estradiol with gonadotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone in the control of growth hormone secretion in the goldfish [J]. Neuroendocrinol, 1992, 56: 483-490.
- [7] Trudeau V L, Soley B D, Wong A O L, et al. Interaction of gonadal steroids with brain dopamine and gonadotropin-releasing hormone in the control of gonadotropin secretion in the goldfish [J]. Gen Comp Endocrinol, 1993, 89: 39-50.
- [8] Lizard B, Benmami S, Saligaut C. Involvement of estradiol in a catecholamine in inhibitory tone of gonadotropin release in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Gen Comp Endocrinol, 1995, 99: 192-196.
- [9] Kab O. The reproductive brain in fish [J]. Fish Physiol Biochem, 1993, 11: 85-98.
- [10] 周立斌. 长臀鲢性腺发育和生殖内分泌调控的研究[D]. 广州:中山大学,2003.
- [11] 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: 43-58.
- [12] Timmers R J M, Lambert J G D. Catechol-O-methyltransferase in the brain of the male African catfish, *Clarias gariepinus*: distribution and significance for the metabolism of catecholamines and dopamine [J]. Fish Physiol Biochem, 1989, 7: 201-210.

① Cayaco J B E, Scholz R W, Trudeau V L, et al. Sexual steroids and regulation of puberty in male African catfish (*Clarias gariepinus*) [A]. Proceedings of the Fifth international symposium on the reproductive physiology of fish [C]. 1995. 360.

In vitro studies of effects of 17β -estradiol and methyl-testosterone on gonadotropin secretion by pituitary of helmet catfish (*Cranoglanis boudierus*)

ZHOU Li-bin^{1,2}, LIU Xiao-chun¹, YE Wei³, LIN Hao-ran¹

(1. Institute of Aquatic Economic Animals, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China; 2. Department of Life Science Huizhou University, Huizhou 516001, China; 3. Panyu State-level Tilapia Breeding Center, Guangzhou 511453, China)

Abstract: Sex steroids have a negative feedback effect on gonadotropin (GTH) release at sexually development stage, while have a positive feedback effect on GTH release at immature stage. The helmet catfish (*Cranoglanis boudierus*) at sexual mid-development stage were employed, and the experiment fish were divided into four groups (every group repeats 3 times and with 6 fish): 1. Chronic 17β -Estradiol (E_2) administration; 2. E_2 administration accompanying with Analogue of gonadotropin-releasing hormone (GnRH-A) pulse administration; 3. Chronic methyl-testosterone (MT) administration; 4. MT administration accompanying with GnRH-A pulse administration. The effects of E_2 and MT on the GTH secretion by the pituitary of helmet catfish (*Cranoglanis boudierus*) were studied by using in vitro perfusion system for pituitary fragment and radioimmunoassay for GTH. Basal GTH secretion from pituitary fragments was significantly inhibited by chronic administration of E_2 ; basal GTH secretion from pituitary fragments was inhibited by chronic administration of MT, and GTH secretion induced by GnRH-A was also inhibited by E_2 and MT; high concentrations of E_2 and MT ($10 \mu\text{mol/L}$) administration had stronger inhibitory effect than low concentration of E_2 and MT ($0.1 \mu\text{mol/L}$) administration. The results showed that E_2 and MT administration had a negative feedback effect on basal GTH release from the pituitary fragments of helmet catfish in sexual mid-stage, and directly affected pituitary GTH regulation.

Key words: *Cranoglanis boudierus*; 17β -Estradiol and methyl-testosterone; gonadotropin; perfusion

Corresponding author: LIN Hao-ran. E-mail: zlb@hzu.edu.cn