

促性腺激素释放激素和多巴胺 对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)离体 脑垂体细胞分泌促性腺激素的影响

侯亚义

(南京大学医学院, 南京 210093)

提 要 本文研究了不同性腺发育时期淡水饲养的雌雄虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)血浆促性腺激素(GTH)浓度的变化规律;以及在离体条件下,探讨了促性腺激素释放激素(GnRH)、GnRH拮抗物和多巴胺对虹鳟脑垂体细胞分泌促性腺激素(GTH-Ⅱ)的影响。结果表明:(1)在雌性,血浆中GTH-Ⅱ的水平随性腺发育而逐渐增高;在雄性,仅排卵期血浆中GTH-Ⅱ的水平明显增高。(2)未成熟期和成熟期的雌性虹鳟脑垂体细胞对sGnRH和cGnRH刺激的敏感性表现不尽相同。成熟期和排卵后的脑垂体细胞对GnRH的刺激较为敏感,GTH-Ⅱ的分泌量较多。(3)在没有sGnRH的存在下,GnRH拮抗物对GTH-Ⅱ的分泌不发生作用,而在sGnRH的存在下,GnRH拮抗物对GTH-Ⅱ的分泌表现出浓度依赖的抑制作用。(4)在没有sGnRH的存在下,多巴胺对GTH-Ⅱ的分泌不发生作用,而当多巴胺的浓度一定时,随着sGnRH浓度的增加,GTH-Ⅱ分泌的量增大。另外,不论sGnRH还是cGnRH都不影响不同时期的脑垂体细胞GTH-Ⅰ的分泌。这些结果可为虹鳟的人工催产提供一些理论依据。

关键词 虹鳟 促性腺激素 促性腺激素释放激素 多巴胺 脑垂体细胞

分类号 Q575.12 Q959.4

在许多鱼类,脑垂体中促性腺激素(GTH)存在有两种类型,GTH-Ⅰ和GTH-Ⅱ,它们的合成和分泌受到许多因素的调节,除水温和光周期等外界环境因素外,性中枢中神经分泌细胞合成的一种神经肽—促性腺激素释放激素(GnRH)和具有生理活性的单胺类物质—多巴胺(DA)也调节着促性腺激素(GTH)的合成和分泌^[1]。鲑科(*Salmonidae*)鱼类存在两种类型的GnRH,即鲑型GnRH(sGnRH)和鸡型GnRH(cGnRH)^[2],而且sGnRH的含量随着性成熟而发生变化^[3],这提示在鲑科鱼类sGnRH可能直接调节着GTH的合成和分泌,但是,缺乏直接的实验证据。另一方面,多巴胺(DA)对不同鱼种GTH-Ⅱ分泌的抑制强弱不同^[4],而且在鲑科鱼类的排卵时期,多巴胺(DA)对促性腺激素(GTH)合成和分泌表现极弱的抑制作用^[5],对其成熟时期的作用还不清楚。因此,本研究将探讨在体外培养条件下,促性腺激素释放激素(GnRH)和多巴胺(DA)对不同成熟时期虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)脑垂体细胞分泌促性腺激素(GTH-Ⅱ)的影响。

· 日本水产机构和南京大学“211”基金联合资助项目。

收稿日期:2000-02-05;收到修改稿日期:2000-04-27。侯亚义,男,1960年生,博士,教授。

1 材料和方法

1.1 实验鱼

未成熟的雌雄虹鳟各 10 尾(平均体重约为 50g; GSI 为 0.15 ± 0.07)、生殖季节的成熟雌雄鱼各 10 尾(平均体重约 700g; GSI: 雌 3.05 ± 0.11 , 雌 5.15 ± 0.27)和排卵或排精后的雌雄鱼各 10 尾(平均体重: 约 540g; GSI: 雌 1.05 ± 0.23 , 雌 1.15 ± 0.19)。实验用鱼饲养在 1000L 的水槽中, 并提供 14℃ 的过滤循环水, 光照为 14L: 10D。每天用商业虹鳟颗粒饲料按鱼体重 1% - 2% 喂养一次。在适应实验条件三周后, 开始进行实验。

1.2 脑垂体细胞的分离

鱼用浓度为 300mg/L 的 2-苯氧基乙醇麻醉后, 迅速从尾静脉抽血和摘出脑垂体。血液经离心, 获得的血浆保存于 -25℃ 待用。脑垂体被放入冰冷的 Hank 氏平衡盐溶液中, 冲洗 3-4 次后, 被切成碎片, 放入含胶原纤维酶的 Hank 氏平衡盐溶液中, 在 14℃ 下放置 1h 左右后, 打散脑垂体, 使其成为脑垂体细胞悬浮液, 经过滤、离心, 获得纯净的脑垂体细胞。将这些细胞放入 Hank 氏平衡盐溶液中, 进行细胞计数、检查细胞生存率、调正细胞数为 1×10^6 /ml。活细胞不得低于 95%。

1.3 细胞培养

用 0.1% poly-L-lysine (Sigma) 包被 48 孔培养板的每个孔, 然后加入 0.5ml 的细胞悬浮液, 18℃ 孵育 3d, 待细胞附着与孔壁后, 换上新的 RPMI - 1640 培养液 (Sigma)。

1.4 实验内容

(1) 分别从 10 尾未成熟、生殖季节的成熟和排卵或排精后的雌雄鱼的尾静脉抽取 1ml 血液, 然后经离心, 获得的血浆保存于 -25℃ 待用或立即用下面描述的放射免疫测定法测定其中的 GTH - II 含量。

(2) 分别从未成熟、生殖季节的成熟和排卵后的雌虹鳟分离脑垂体细胞, 将获得的脑垂体细胞分组, 按上述方法进行细胞培养, 3d 后, 待细胞附着于孔壁后, 换上新的 RPMI - 1640 培养液 (Sigma), 在不同剂量 sGnRH 或 cGnRH (购于 Peninsula Lab) 的存在下, 继续培养 24h。小心地从每孔中取出培养的上清液, 用下面描述的放射免疫测定法测定其中的 GTH - II 含量。对于产卵后的雌虹鳟仅调查 sGnRH 对垂体细胞分泌 GTH - II 的作用。

(3) 分别从生殖季节的成熟和排卵后的雌虹鳟分离脑垂体细胞进行分组和培养, 待细胞附着于孔壁后, 换上新的 RPMI - 1640 培养液 (Sigma), 在不同剂量 sGnRH 和 GnRH 拮抗物 ([Ac-3, 4-dehydro-Pro¹, D-pF-Phe², D-Trp^{3, 6}]GnRH, Sigma) 条件下继续培养 24h。或在不同剂量 sGnRH 和多巴胺 (Sigma) 条件下继续培养 24h。取出上清液, 测定其中的 GTH - II 含量。

1.5 放射免疫测定法 (RIA)

依照已报道的放射免疫测定法 (RIA)^[6] 检测培养液中的 GTH - II 浓度。

1.6 数据统计方法

不同实验组之间的差异用方差分析和 Duncan 氏新多元 test 法进行检验。

2 结果

2.1 血浆中 GTH - II 的水平

在雄性, 成熟期和排精期比未成熟期血浆中 GTH - II 的水平明显高, 但成熟期和排精期

血浆中 GTH-Ⅱ 的水平无明显差异。在雌性,未成熟期和成熟期血浆中 GTH-Ⅱ 的水平很低(1ng/mL 左右),而排卵后血浆中 GTH-Ⅱ 的水平高达 50ng/mL(图 1)。

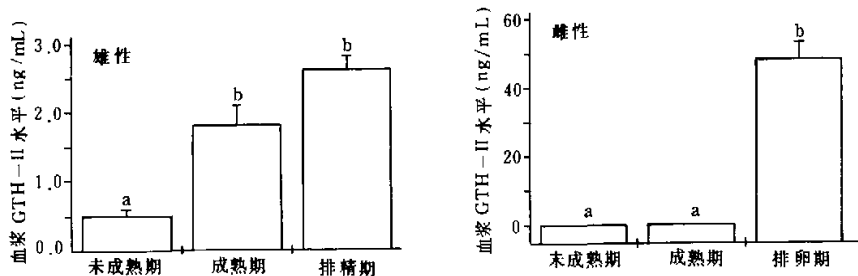


图 1 雌雄虹鳟不同成熟时期血浆中 GTH-Ⅱ 的变化水平。

有意义的差异用不同的字母表示($P < 0.05$)

Fig. 1 Plasma levels of GTH-Ⅱ in male and female rainbow trout during immature, mature and ovulated periods. Each value is expressed as the mean \pm SE ($N = 10$).

Significant differences between columns were indicated by different letters ($P < 0.05$)

2.2 GnRH 作用

两种类型的 GnRH, 即 sGnRH 和 cGnRH 对未成熟期和成熟期脑垂体细胞分泌 GTH-Ⅱ 的作用基本相似, 但是, 在未成熟期和成熟期的虹鳟, 脑垂体细胞对 sGnRH 和 cGnRH 刺激的敏感性表现不尽相同。 10^{-12} mol/L 的 sGnRH 和 cGnRH 对未成熟期脑垂体细胞 GTH-Ⅱ 分泌没有表现出促进作用, 但明显促进成熟期脑垂体细胞 GTH-Ⅱ 的分泌。 10^{-9} mol/L 和 10^{-6} mol/L 的 sGnRH 和 cGnRH 都能明显促进未成熟期和成熟期脑垂体细胞 GTH-Ⅱ 的分泌(图 2-A, B)。对于排卵后的脑垂体细胞, 10^{-12} mol/L 浓度以上的 sGnRH 都表现出明显的刺激作用, 而且 10^{-9} mol/L sGnRH 的刺激作用更强(图 2-C)。另外, 不论 sGnRH 还是 cGnRH 对同时期的脑垂体细胞 GTH-Ⅰ 的分泌都不表现作用。

2.3 GnRH 拮抗物对 GTH-Ⅱ 的作用

在没有 sGnRH 的存在下, GnRH 拮抗物对 GTH-Ⅱ 的分泌不发生作用, 而在 10^{-8} mol/L sGnRH 的存在下, GnRH 拮抗物对 GTH-Ⅱ 的分泌表现出浓度依赖的抑制作用, 即 GnRH 拮抗物的浓度越高, 对 GTH-Ⅱ 分泌的抑制作用越强(图 3)。

2.4 多巴胺对 GTH-Ⅱ 的作用

在没有 sGnRH 的存在下, 多巴胺对 GTH-Ⅱ 的分泌不发生作用, 而当多巴胺的浓度一定时(10^{-6} mol/L), 随着 sGnRH 浓度的增加, GTH-Ⅱ 分泌的量增大(图 4)。

3 讨论

伴随着性腺成熟 GTH-Ⅱ 的水平自发地增加, 而且 GTH-Ⅱ 的水平以两种类型的 GnRH 加入浓度的提高而提高, 但 GTH-Ⅰ 的水平既不受成熟期的影响, 也不受两种类型的 GnRH 的影响。这些结果提示, 虹鳟的 GTH-Ⅱ 的分泌直接地受 GnRH 的调节。可是, 有研究报告, GnRH 的类似物能增加培养下的脑垂体的 GTH-Ⅰ 分泌^[7], 这可能由于自然的 GnRH

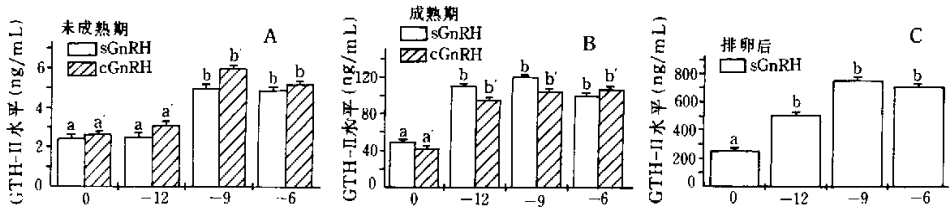


图2 sGnRH和cGnRH对不同成熟时期脑垂体细胞分泌GTH-Ⅱ的影响。

有意义的差异用不同的字母表示($P < 0.05$)。横坐标上的摩尔浓度用lg值表示。

Fig. 2 Effects of sGnRH and cGnRH on the GTH release from *in vitro* pituitary cells of immature, mature and ovulated female rainbow trout. Each value is expressed as the mean \pm SE ($N = 10$). Significant differences between columns were indicated by different letters ($P < 0.05$). Mol concentrations of sGnRH and cGnRH were expressed as lg values at abscissa axis.

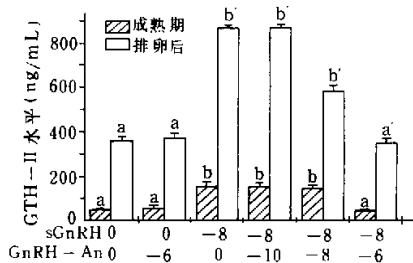


图3 在sGnRH的存在下GnRH拮抗物(GnRH-An)对不同成熟时期脑垂体细胞分泌GTH-Ⅱ的影响。有意义的差异用不同的字母表示($P < 0.05$)。横坐标上的摩尔浓度用lg值表示。

Fig. 3 Effects of GnRH antagonist (GnRH-An) on the GTH release from *in vitro* pituitary cells of mature and ovulated female rainbow trout with or without sGnRH. Each value is expressed as the mean \pm SE ($N = 10$). Significant differences between columns were indicated by different letters ($P < 0.05$). Mol concentrations of sGnRH and GnRH antagonist were expressed as lg values at abscissa axis.

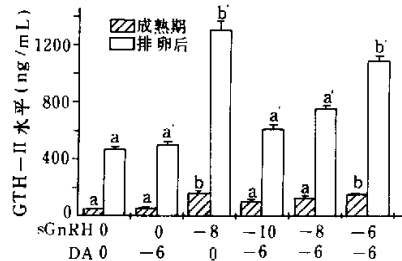


图4 在sGnRH的存在下多巴胺(DA)对不同成熟时期脑垂体细胞分泌GTH-Ⅱ的影响。有意义的差异用不同的字母表示($P < 0.05$)。横坐标上的摩尔浓度用lg值表示。

Fig. 4 Effects of dopamine (DA) on the GTH release from *in vitro* pituitary cells of mature and ovulated female rainbow trout with or without sGnRH. Each value is expressed as the mean \pm SE ($N = 10$). Significant differences between columns were indicated by different letters ($P < 0.05$). Mol concentrations of sGnRH and dopamine were expressed as lg values at abscissa axis.

与GnRH的类似物的生物活性不同而引起的另一方面,对不同成熟阶段的鱼脑垂体细胞,明显提高GTH-Ⅱ分泌所需要sGnRH的最低浓度不同,而且不论对于那种成熟阶段,GTH-Ⅱ的分泌水平依赖于sGnRH量。这种现象在其它鱼类还未见报道。一般认为在金鱼的脑垂体中

存在有两种类型的 GnRH 受体,一种为高亲和性低能力的,另一种为低亲和性高能力的.产卵期这两种受体都增多,而 GTH-Ⅱ的分泌可能仅与高亲和性低能力的受体多少有关^[8].

虽然一般认为,在一些生物体内,sGnRH 起促进 GTH 释放的作用,cGnRH 可能在脑内作为神经递质起作用,但是虹鳟的脑垂体中不存在 cGnRH^[9].实验 2.2 表明了 cGnRH 能促进 GTH-Ⅱ的分泌,这可能是由于 cGnRH 与 sGnRH 有相似结构的原因.另外,随着 GnRH 量的增加,GTH-Ⅱ的分泌被抑制,这可能是由于 GTH 细胞表面的 GnRH 受体功能降低的缘故,与对哺乳类、金鱼的实验结果一致^[10-12].

许多实验证明多巴胺直接作用于金鱼脑垂体以抑制 GTH 的自动分泌活动^[1],在离体试验时,用孵育金鱼脑垂体的碎片或分散细胞能大量自动分泌 GTH,如果加入多巴胺,自动分泌量明显降低,而且对成熟的金鱼多巴胺表现较强的抑制作用^[13-16].但在本实验中,不论在成熟期或排卵后,当 sGnRH 不存在时,多巴胺不影响 GTH-Ⅱ的自发分泌.另一方面,不论在成熟期或排卵后,当 sGnRH 存在时,GnRH 拮抗物能够明显抑制虹鳟 GTH-Ⅱ的分泌,但在金鱼 GnRH 拮抗物完全阻碍了 GnRH 的作用^[17,18].这些在金鱼与虹鳟表现的不同现象可能与鱼种的不同有关,还需进一步研究.另外,多巴胺对排卵后 GTH-Ⅱ分泌的抑制作用远远小于对成熟期作用,这与以前的研究结果相似^[5,19],这可能是由于随着生殖腺的成熟,虹鳟 GnRH 受体数量增加,或者多巴胺受体的数量减少的缘故.

参 考 文 献

- 1 Peter R E, et al. Brain regulation of reproduction in teleosts. *Bull Inst Zool*, 1991, 16: 89-118
- 2 Amano M, et al. Immunocytochemical demonstration of salmon GnRH and chicken GnRH-Ⅱ in the brain of masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *J Comp Neurol*, 1991, 324:587-597
- 3 Amano M, et al. Changes in levels of GnRH in the brain and pituitary and GTH in the pituitary in male masu salmon, (*Oncorhynchus masou*), from hatching to maturation. *Fish Physiol Biochem*, 1993, 11:1-6
- 4 Copeland P A, Thomas P. Control of gonadotropin release in the Atlantic croaker (*Micropogonius undulatus*): Evidence for lack of dopaminergic inhibition. *Gen Comp Endocrinol*, 1989, 74:474-483
- 5 Van der Kraak G, et al. Dopamine involvement in the regulation of gonadotropin secretion in coho salmon. *Can J Zool*, 1986, 64:1245-1248
- 6 Kobayashi M, et al. Radioimmunoassay for Salmon Gonadotropin. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1987, 53:995-1003
- 7 Swanson P, et al. Gonadotropins I and II in juvenile coho salmon. *Fish Physiol Biochem*, 1989, 7:169-176
- 8 Habibi H R, et al. Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor activity in goldfish and catfish: seasonal and gonadal effects. *Fish Physiol Biochem*, 1989, 7:109-118
- 9 Okuzawa, K, et al. Differences in salmon GnRH and chicken GnRH-Ⅱ contents in discrete brain areas of male and female rainbow trout according to age and stage of maturity. *Gen Comp Endocrinol*, 1990, 80: 116-126
- 10 Hazum E and Conn P M. Molecular mechanism of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action: 1. The GnRH receptor. *Endocrine Review*, 1988, 9:379-386
- 11 Habibi H R. Homologous desensitization of GnRH receptors in the goldfish pituitary: Effects of native GnRH peptides and a synthetic GnRH antagonist. *Biol Reprod*, 1991, 44:275-283
- 12 Chang J P, et al. Intracellular mechanisms mediating gonadotropin and growth hormone release in goldfish, *Carassius auratus*. *Fish Physiol Biochem*, 1993, 11:25-33
- 13 Chang J P, Peter R E. Effects of dopamine on gonadotropin release in female goldfish, *Carassius auratus*. *Neuroen-*

- ocrinology, 1983, 36:351 - 357
- 14 Charig J P, Peter R E. Effects of pimoziide and des Gly¹⁰, [D-Ala⁶] luteinizing hormone-releasing hormone ethylamide on serum gonadotropin concentrations, germinal vesicle migration, and ovulation in female goldfish, *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol*, 1983, 52:30 - 37
- 15 Sokolowska M, et al. Seasonal effects of pimoziide and des Gly¹⁰[D-Ala⁶] LH-RH ethylamide gonadotropin secretion in goldfish. *Gen Comp Endocrinol*, 1985, 57:472 - 479
- 16 Sokolowska M, et al. The effects of different doses of pimoziide and [D-Ala⁶, Pro⁹ Nethylamide] (LHRH-A) gonadotropin release and ovulation in female goldfish. *Can J Zool*, 1985, 63:1252 - 1256
- 17 Murthy C K, et al. In vitro characterization of gonadotropin-releasing hormone antagonists in goldfish, *Carassius auratus*. *Endocrinology*, 1993, 133:1633 - 1644
- 18 Murthy C K, et al. In vivo actions of a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist on gonadotropin - II and growth hormone secretion in goldfish, *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol*, 1994, 96:427 - 437
- 19 Billard R, et al. Advancement and synchronisation of spawning in *Salmo gairdneri* and *S. Trutta* following administration of LHR-H combined or not with pimoziide. *Aquaculture*, 1984, 43:57 - 66

Effects of Gonadotropin-releasing Hormone (GnRH) and Dopamine on Gonadotropin(GTH) Secretion from *in vitro* Pituitary Cells of Rainbow Trout

HOU Yayi

(Medical School, Nanjing University, Nanjing 210093, P. R. China)

Abstract

Plasma gonadotropin (GTH) levels during immature, mature and ovulated periods and effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and dopamine on GTH secretion of *in vitro* pituitary cells of rainbow trout were investigated. Plasma GTH levels increased with gonadal development. The different effects of sGnRH and cGnRH on GTH - II secretions of pituitary cells *in vitro* from immature, mature and ovulated periods of rainbow trout were observed. GnRH antagonist did not change GTH - II contents under the absence of sGnRH while GnRH antagonist suppressed dose-dependently GTH - II secretions of pituitary cells in combination with sGnRH. Dopamine also did not affect GTH - II levels under the absence of sGnRH, while GTH - II secretions of pituitary cells were enhanced when the dosage of sGnRH was increased with the presence of constant levels of dopamine. In addition, sGnRH and cGnRH had no effects on GTH - I secretions. These results provide some basic informations for modulating the spontaneous release of GTH - II and controlling fish reproduction.

Key Words Rainbow trout, gonadotropin, gonadotropin-releasing hormone (GnRH), dopamine, pituitary cell