

鲤、鲢、草鱼促性腺激素垂体含量 及血清浓度日周期变化的关系*

潘家秀 王育西

(中国科学院上海生物化学研究所)

许谷星 沈仁澄

(浙江省淡水水产研究所)

鲍 璿 徐维奇

(中国科学院上海生理研究所)

提 要

淡水鱼类有的在池塘中能自然产卵,如鲤(*Cyprinus carpio*)、鳊(*Megalobrama amblyocephala*)等,有的鱼必须给予外源激素才能产卵,如青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)。为探索产生这种差别的原因,本文用放射免疫方法测定了鲤、鲢、草鱼产卵季节促性腺激素(GTH)在垂体中的含量和血清中浓度的日周期变化。

鲤、草、鲢24小时血清GTH浓度呈脉冲式波动,白天出现3-4次高峰,夜间雌的有时还有一次高峰。鲤高峰值多在20-40毫微克/毫升血清,峰谷在5-15毫微克/毫升血清,GTH浓度始终保持高水平,而草、鲢高峰值仅2-8毫微克/毫升血清,峰谷0.1-1毫微克/毫升血清。草、鲢每只垂体GTH含量较高,约为鲤的2.5倍。以上数据说明草、鲢垂体释放GTH比鲤少。这种差别可能反映了在池塘中鲤能自产,而草、鲢不能自产的原因。

草鱼垂体离体培养,白天和黑夜取材,对LRH-A⁽¹⁾的反应性不同,白天的反应较弱,对此进行了讨论。

淡水鱼类中有的鱼在池塘中能自然产卵,如鲤、鳊等,有的鱼必须给予外源激素,人绒毛膜促性腺激素(HCG),促黄体素释放激素或其类似物LRH-A^[2,5,6,11]才能产卵,如青、草、鲢、鳙,其原因何在?本文从产卵季节垂体GTH含量和血清中GTH浓度的日周期变化进行了探讨。

* 本工作中放射免疫在上海华东医院同位素室测定,并承江苏省昆山县多营局虞良铨同志和昆山县水产养殖场大力支持,王时妹、林南琴、俞鹤年、冯敏琦等同志参加取血,特此一并致谢。

(1) LRH-A: 促黄体素释放激素类似物, 焦谷·组·色·丝·酪·D-丙·亮·精·脯乙基胺, 中国科学院上海生物化学研究所东风试剂厂产品。

材 料 和 方 法

(一) 血 清 收 集

鲤鱼：浙江省淡水水产研究所提供，雌、雄共 10 尾。1978 年 4 月 16 日 3 时至 21 时（水温 15—18°C），每间隔一定时间自尾动脉采血，室温放置，收集血清。

草鱼：江苏省昆山县水产养殖场提供，雌、雄各 2 尾。1978 年 5 月 15 日 3 时至 5 月 16 日 3 时（水温 23—28°C），采集血清，方法同上。

鲢鱼：浙江省淡水水产研究所提供，雌、雄各 2 尾。1978 年 6 月 4 日 3 时至 6 月 5 日 3 时（水温 20—25°C），采集血清，方法同上。

(二) 鲤、鲢、草鱼垂体 GTH 的提取

鲤、鲢、草鱼垂体的采集地点同上。垂体摘下后，立即投入以干冰冷却的丙酮中脱水，换液一次后，制成丙酮粉，以 40% 乙醇反复抽提 3 次，分别在 3500 转/分钟离心 20 分钟，合并上清液冻干。

(三) 垂体离体培养

草鱼（1978 年 6 月 2 日由浙江省淡水水产研究所提供），分两批取材，一批在 5:00—7:00，一批在 19:10—20:45。草鱼活杀，打开头盖骨，取出垂体，在解剖镜下，各沿纵沟对半分成两个对称部分，分别置于 MMC 培养液中^[8]。培养液的配方是：甲液——在 900 毫升双蒸水中加 NaCl 7.04 克，KCl 0.67 克，无水 MgSO₄ 0.034 克，MgCl₂ 0.26 克，无水 CaCl₂ 0.41 克，NaH₂PO₄·2H₂O 0.18 克，葡萄糖 1 克；乙液——在 100 毫升双蒸水中溶 NaHCO₃ 1 克。在甲液中滴加乙液，调 pH 至 7.2，再加双蒸水至 1 升，细菌漏斗过滤。培养温度 24—25°C，培养气体 50% O₂，50% 空气。

由于垂体培养在 3 小时内，自动释放 GTH^[9]，先预保温 4.5 小时，换液，再培养 1—1.5 小时，取出（即培养液 a），以此作为基值。然后每个垂体取半个加含有不同剂量的 LRH-A 的培养液，另一半加不含 LRH-A 的培养液（对照），在同一个缸内培养，2 小时后取出（即培养液 b）。各次取出的培养液，均保存于低温冰箱，用放射免疫法测定 GTH 含量。为尽可能避免由于垂体分割不均匀、条件不完全相同所造成的误差，以分泌系数来表示阳性，或阴性反应。以 $\left[\frac{GTH_b}{GTH_a} \right]_{LRH-A}$ 和 $\left[\frac{GTH_b}{GTH_a} \right]_{对照}$ 分别代表加 LRH-A 和不加 LRH-A 的半垂体 GTH 释放与基值相比所增长的倍数，并取二者的比值，即加 LRH-A 后 GTH 的增长倍数比对照所增长的倍数所高出的倍数作为分泌系数。分泌系数小于或等于 1 作为阴性反应，大于 1 作为阳性反应。

(四) GTH 的放射免疫测定

鲤、鲢、草鱼血清或垂体抽提液的冻干粉用聚乙二醇法^[11]测定；草鱼垂体培养液用双

抗体法^[9]测定。

结 果

(一) 垂体 GTH 含量

鲤每只垂体平均含 GTH 70—90 微克,草、鲢每只垂体平均含 GTH 160—220 微克。鲤垂体 GTH 含量比草、鲢的低。

(二) 血清 GTH 浓度及其日周期变化

鲤、草、鲢血清 GTH 浓度呈脉冲式波动,上午在 5:00—11:00 之间出现数个高峰,有的在下午 14:00—17:00 或 21:00 (雌鲤、鲢)还有另一个高峰(图 1-3。由于鲤鱼峰形相似,交错甚多,图 1 仅作出了 6 条的曲线。)此结果说明垂体在白天释放 GTH 次数频繁,释放大,有的雌性鲢和鲤在夜间有一次释放。鲤和草、鲢最大不同之处是鲤血清 GTH 浓度始终保持于高水平,高峰值多在 20—40 毫微克/毫升血清(有 1 条雄鲤,高峰达 340 毫微克/毫升血清),峰谷在 5—15 毫微克/毫升血清;而草、鲢峰谷仅 0.1—1.0 毫微克/毫升血清,即使高峰也只有 2—8 毫微克/毫升血清,但有 1 条雄草鱼和 1 条雄鲢高峰分别达 22 和 40 毫微克/毫升血清。

(三) 草鱼垂体离体培养白天和黑夜对 LRH-A 的反应性

5:00—7:00 取的草鱼垂体离体培养,LRH-A 剂量自 0.2—20 微克/毫升培养液,阳性反应率均甚低,6 个垂体中只有 1 个有明显反应,有 3 个分泌系数小于 1,LRH-A 似有抑制作用。夜间 19:00—21:00 取材培养的垂体,LRH-A 剂量同上,9 个垂体中有 6 个有显著的阳性反应,有 1 个雄草鱼的垂体分泌系数高达 5,结果见表 1。

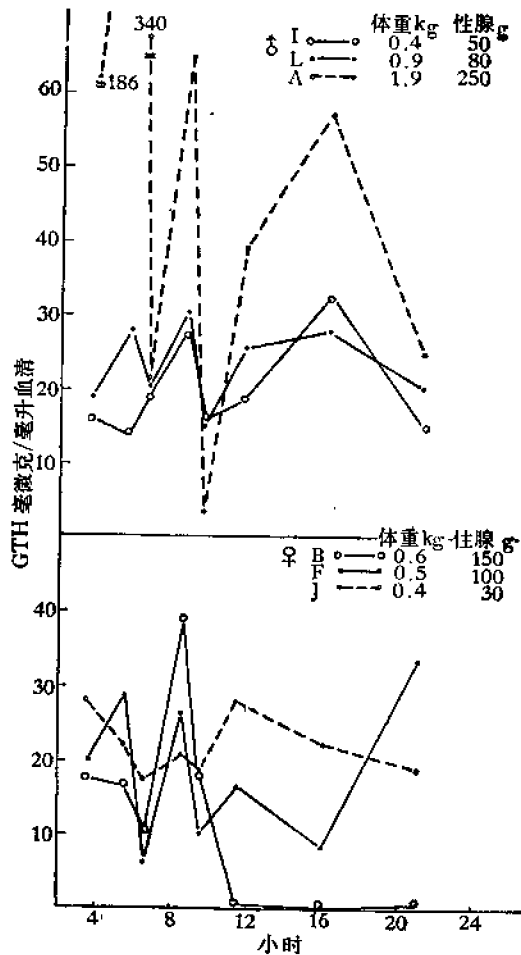


图 1 鲤鱼血清 GTH 24 小时浓度变化

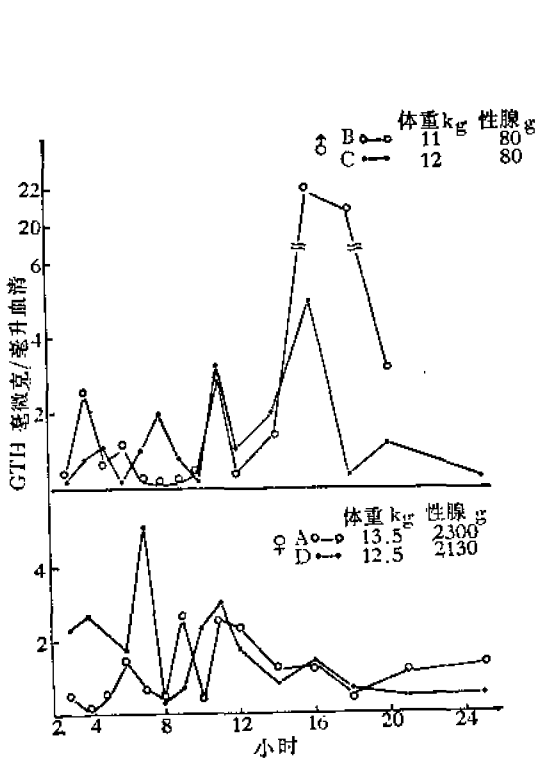


图2 草鱼血清 GTH 24 小时浓度变化

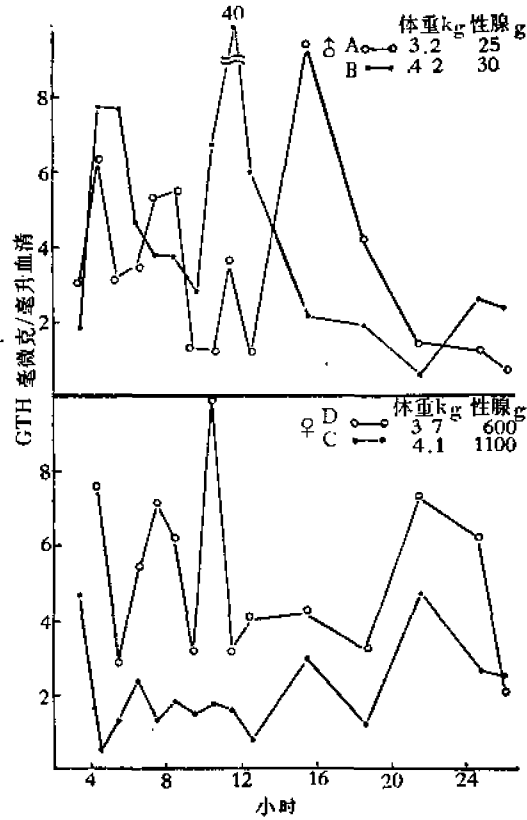


图3 鲢鱼血清 GTH 24 小时浓度变化

讨 论

一年四季垂体和血液中 GTH 含量和浓度的变化参与了鱼类的性腺发育和配子发生的调控^[4,12]；产卵季节的垂体和血液中 GTH 的浓度及其日周期变化，则直接影响着鱼类精卵的排放^[9,14,15]。因此不同的鱼对 LRH-A 反应性不同，可能与 GTH 的含量和浓度有关。本文对有代表性的鲤和草、鲢产卵期 24 小时血清作了 GTH 分析测定。鲤在上午 5:00—11:00 出现高峰，与鲤在自然条件下产卵的时间重合。根据前文^[2]，鲤在产卵瞬间血清 GTH 浓度剧增，出现异常高峰，可以认为 GTH 的日周期高峰出现是为产卵作准备。与此相似的有金鱼^[9]和鳊鱼^[15]。金鱼上午 11:00 血清 GTH 出现一个高峰，下午 15:00 和 18:00 还有 2 个较小的峰、排卵时的峰值比排卵前每天高峰值要高出 5 倍之多。鳊鱼在生产前，垂体 GTH 的分泌也有 4 小时的高峰，几近释放了正常维持水平的 2/3，而后是 4 小时的恢复期和 16 小时维持在一定水平。草、鲢在产卵季节 GTH 的释放也呈脉冲式，高峰时间与鲤相差不多，但其血液中 GTH 浓度始终很低，比鲤差 10 倍左右。可能正是这种差别反映了为什么鲤能在池塘自产，而四大家鱼有赖于外源性激素。

雄性鲤、鲢、草白天往往出现一次 GTH 大分泌，血清中含量比其他峰值高 5 倍以上，垂体离体培养用 LRH-A 刺激，GTH 分泌系数雄鱼也常有特别高者，雌鱼很少出现这种

现象,这可能可以解释使用 LRH-A 催产时,雄鱼所需剂量是雌鱼的一半。

鲤垂体中 GTH 含量与草、鲢的也有明显的差别,鲤垂体 GTH 含量少,但血液中 GTH 含量高,说明垂体处于大量释放 GTH 的状态,其浓度足以促使卵巢排卵和产卵。池养草鱼、鲢缺乏自然环境大浪激流等生态条件对中枢神经系统的刺激,下丘脑 LRH 的合成和释放较少,所合成的 GTH 又在垂体中贮存较多,血液 GTH 难达到产卵所必需的浓度,只有在注射外源激素后,才能产卵。

为进一步证实上述观点,还有待分析在长江或水库中鲤、鲢、草鱼垂体和血液中 GTH 的含量和变化。

鲤、鲢、草鱼在产卵季节 GTH 分泌的日周期性可能与光照有关。哺乳动物和鸟类在短光照或无光刺激下松果体 5-羟色胺 *N*-乙酰转移酶活力上升,褪黑激素的合成和释放也随之增加,抑制促性腺激素的释放^[7,10]。鱼类的松果体也对光敏感,因此可能也是通过褪黑激素抑制 GTH 的释放^[18,19]。草鱼垂体离体培养,以 LRH-A 激发 GTH 分泌的实验,似可间接说明光照对下丘-垂体-性腺轴的调节作用。白天草鱼垂体离体加 LRH-A 后 GTH 分泌量少,有的甚至低于不加 LRH-A 的对照半垂体,表明在活体条件下,白天垂体不受褪黑激素抑制,GTH 释放多、贮量少,并处于合成状态。夜间取下的垂体,加 LRH-A 后,GTH 分泌量大,意味着草鱼处于无光照时,活体的垂体 GTH 释放受到褪黑激素的抑制,贮量大,当垂体被摘下,脱离松果体和褪黑激素的控制,经 LRH-A 刺激,GTH 即大量释放。至于青、鲢、鳙、鲫等是否也有这种现象,有待继续研究。

表 1 草鱼垂体离体培养白天和黑夜对 LRH-A 的反应性

鱼号	性别	体重(公斤)	成熟度(期)	LRH-A (微克/毫升培养液)	分泌系数
夜 2	♂	3.2	V	2	5.4
3	♀	3.8	II	2	1.0
4	♂	4.3	II	20	1.1
5	♀	4.4	IV	2	1.6
6	♀	4.0	IV	20	2.1
7	♂	3.9	II	20	1.3
8	♀	3.2	II	2	1.2
9	♂	3.4	V	20	0.3
10	♂	3.6	II	0.02	1.2
日 1	♀	3.9	IV	2	0.5
2	♀	4.2	II	0.02	0.1
3	♂	2.9	III	2	0.6
8	♀	4.3	IV	20	1.6
5	♀	3.3	IV	2	1.0
7	♂	3.6	III	20	1.0

参 考 文 献

- [1] 王育西、潘家秀、蒋茂松, 1980。鲤促性腺激素放射免疫测定方法的改进——聚乙二醇的应用。水产学报, 4 (1): 39—45。
- [2] 经济鱼类激素应用研究协作组, 1980。一种新的高效能的鱼用催产剂——促黄体生成素释放激素类似物的应

- 用。中国科学,4:388—393。
- [3] 厦门水产学院鱼类生殖生理科研小组、中国科学院上海生物化学研究所多肽激素组,1978。鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 血液中促性腺激素放射免疫测定。生物化学与生物物理学报,10:399—407。
- [4] 曹杰超、欧阳玉梅,1975。鲤鱼脑垂体促性腺激素含量年周期变化的研究。水生生物学集刊,5:535—540。
- [5] 福建、江苏、上海淡水经济鱼类人工繁殖协作组,1976。合成丘脑下部促黄体生成素释放激素(LRH)的类似物对家鱼的催情产卵。生物化学与生物物理学报,8:107—114。
- [6] 福建、江苏、浙江、上海淡水经济鱼类人工繁殖协作组,1977。合成促黄体生成素释放激素的类似物(LRH-A)对家鱼催产效果的进一步探讨。生物化学与生物物理学报,9:15—24。
- [7] 出口武夫,1976。生体リズムの神経調節とその个体発生の机序。伝達物質と受容物質(大塚正徳、竹内昭編) 205—223。
- [8] Breton, B. et al., 1975. Caracterisation partielle d'un facteur hypothalamique de liberation des hormones gonadotropes chez la carpe (*Cyprinus carpio* L.). Etude in vitro. *Gen. Comp. Endoc.*, 25: 405—415.
- [9] Breton, B. et al., 1972. Dosage radioimmunologique des gonadotropines glasmationes chez *Carassius Auratus*, au cours du nycthemere et pendant l'ovulation. *Gen. Comp. Endoc.*, 18: 463—468.
- [10] Cheng, M. F., 1976. Interaction of lighting and other environmental variables on activity of hypothalamo-hypophyseal-gonadal system. *Nature*, 263: 148—149.
- [11] Cooperative Team for Hormonal Application in pisciculture, 1977. A new highly effective ovulating agent for fish reproduction—Practical application of LH-RH analogue for the inducing of spawning of farm fishes. *Scientia Sinica*, 20: 469—474.
- [12] Crim, L. W. et al., 1975. The plasma gonadotropin profile during sexual maturation in a variety of salmonid fishes. *Gen. Comp. Endoc.*, 27: 62—70.
- [13] Fenwick, J. C., 1970. Demonstration and effect of melatonin in fish. *Gen. Comp. Endoc.*, 14: 86—97.
- [14] Fontain, Y. A., 1975. Hormones in fishes. In *Biochemical and biophysical perspectives in marine biology* (Malins, D. C., Sargent, J. R. Ed.), 2: 139—159.
- [15] O'Connor, J. M., 1972. pituitary gonadotropin release patterns in pre-spawning brook trout, *Salvelinus fontinalis*, rainbow trout, *Salmo gairdneri* and leopard frogs, *Rana pipiens*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 43 (4A): 739—746.
- [16] Saxena, P. K., Anand, K., 1977. A comparison of ovarian recrudescence in the catfish, *Mystus tengara* (Ham.) exposed to short photoperiods, to long photoperiods and to melatonin. *Gen. Comp. Endoc.*, 33: 506—511.

ON THE MODE OF PITUITARY GONADOTROPIN RELEASING IN CARPS .

Pan Jiaxiu Wang Yuxi

(*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica*)

Shen Renchen Xu Guxing

(*Fresh-Water Fisheries Institute of Zhejiang Province*)

Pao Xuan Xu Weigqi

(*Shanghai Institute of Physiology, Academia Sinica*)

Abstract

The diurnal fluctuation of serum gonadotropin concentration during the spawning season was studied in the common carp and two species of the "domestic carps", the grass carp (*Otenopharyngodon idellus*) and the silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). In all the species similar rhythmic surges are observed, mainly occurring in daytime. However, the peak and valley values of the serum gonadotropin concentration of the common carp (20-40 vs. 5-15 ng/ml) are considerably higher than those of the grass and silver carps (2-8 vs. 0.1-1 ng/ml). This difference suggests that the secretion of gonadotropin of common carp is high enough for modulating its reproductive activity while, the grass and silver carps cannot spawn, unless exogeneous hormones are given.

In the presence of LRH-A, the in vitro GTH releases of the pituitaries collected in the night is greater than that in daytime. The significance of this phenomenon is discussed.