

文章编号: 1000- 0615(2001)06- 0518- 05

GnRH-A 和紫萁抑制大黄鱼性腺早熟的机制

翁幼竹¹, 方永强¹, 周 晶¹, 刘家富², 谢方靖²

(1. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005; 2. 宁德地区水产技术推广站养殖场, 福建 宁德 352100)

摘要:应用脑垂体组织生理学和免疫组织化学方法, 对 GnRH-A 和紫萁抑制大黄鱼性早熟的作用机制进行了研究。结果表明, 性早熟大黄鱼脑垂体许多促性腺激素分泌细胞的胞质出现空泡, 提示性早熟的原因可能是由于 GtH 细胞提早进入分泌活动所致。长期服用促性腺激素释放激素类似物的养殖大黄鱼(没有性早熟), 它的脑垂体 GtH 细胞对 GnRH 抗独特型抗体发生弱的免疫阳性反应, 而对照组性早熟鱼仍出现强的反应, 表明实验组大黄鱼脑垂体 GtH 细胞对 GnRH-A 的应答能力下降, 出现脱敏效应, 这可能与 GnRH-A 抑制大黄鱼性早熟有关。养殖大黄鱼长期服用紫萁, 它的脑垂体 GtH 细胞膜上 GnRH 受体则没有出现脱敏现象, 提示紫萁抑制大黄鱼性早熟的机制不同于 GnRH 类似物, 确切机制有待进一步研究。

关键词: 大黄鱼; 性早熟; GtH 细胞; GnRH 类似物; 紫萁

中图分类号: S917; Q132.1 文献标识码: A

The mechanism of inhibitory gonadal precocity of GnRH-A and Ziqi in cultured *Pseudosciaena crocea*

WENG You-zhu¹, FANG Yong-qing¹, ZHOU Jing¹, LIU Jia-fu², XIN Fang-jing²

(1. Third Institute of Oceanography, SOA, Xiamen 361005, China;

2. The Experimental Farm of Aquaculture Technology Extension Station, Ningde 352100, China)

Abstract: The mechanism of inhibitory gonadal precocity of GnRH-A and Ziqi in cultured large yellow croaker was studied using pituitary histophysiological methods. The present results indicate that it occurred vacuole in the cytoplasm of many gonadotropic cells in the pituitary of gonadal precocity, which shows that the cause of gonadal precocity may be due to entering the secretory activity of GtH cells in pituitary. The GtH cells of the cultured large yellow croaker, which had been fed with food containing GnRH-A, showed a weak immunopositive reaction to GnRH anti-idiotypic antibodies, while those of the gonadal precocity in the control group showed a strong immunopositive reaction. These results indicate that responsive capability of GtH cells in the experimental group to GnRH-A are weakened, and desensitization effect occurred. It may relate with GnRH-A inhibitory gonadal precocity of large yellow croaker. GnRH receptor on the membrane of GtH cell of the cultured fish, which had been fed with food containing Ziqi, did not show desensitization phenomenon, which indicates the mechanism of inhibitory gonadal precocity of Ziqi differs from GnRH analogues. However, the definitive mechanism still needs further study.

收稿日期: 2001-03-23

基金项目: 国家 863 项目资助(819- 02- 012)

第一作者: 翁幼竹(1968-), 女, 博士, 副研究员。主要从事海洋动物生殖内分泌学的研究。Tel: 0592- 2195277

通讯作者: 方永强(1973-), 男, 福建云霄县人, 研究员。主要从事海洋动物生殖内分泌学的研究。Tel: 0592- 2195277, E-mail: xmwyz

@ public. xm. fj. cn

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Key words: *Pseudosciaena crocea*; precociousness; gonadotropic cell; GnRH-A; Ziqi

在福建省宁德地区海水网箱养殖大黄鱼出现雌雄性早熟, 雌性早熟率达 50% ~ 60%, 雄性为 60% ~ 70%^[1]。方永强等^[2]发现用促性腺激素释放素类似物(gonadotropin-releasing hormone analogue, GnRH-A)和紫萁能够有效地抑制大黄鱼性早熟, 在雌性, 低、高剂量 GnRH-A 组和低剂量紫萁组早熟率均比对照组分别下降 66%、33% 和 33%; 在雄性, 低剂量类似物组和低剂量紫萁组早熟率均比对照组下降 37%。为明了促性腺激素释放素类似物组和紫萁组是通过什么机制来抑制大黄鱼性早熟, 我们用脑垂体组织生理学方法, 对大黄鱼脑垂体促性腺激素分泌细胞(gonadotropic cell, GtH cell)的正常生理活动与大黄鱼服药后对该细胞的影响进行了比较, 同时, 用免疫组织化学方法和 GnRH 抗独特型抗体比较低和高剂量类似物组和对照组脑垂体促性腺激素分泌细胞 GnRH 受体的不同, 从中揭示 GnRH-A 和紫萁抑制大黄鱼性早熟的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

试验在宁德地区水产技术推广站大黄鱼网箱养殖场进行。实验用网箱数量、开始投药时间和方式与文献^[2]相同, 投药后一个月随机从低和高剂量类似物组和紫萁组(实验组)及对照组各取 10 尾, 解剖观察抑制性早熟的情况, 连续取样 5 个月。

1.2 方法

每月从各个网箱取得大黄鱼都是在养殖场进行处理, 先测量鱼体长, 后称重, 其体长为 15.5~25.8 cm, 体重 60~360g。然后, 解剖取出性腺(卵巢和精巢), 肉眼确定其发育时期。最后, 实验组和对照组正常和性早熟的大黄鱼都在间脑腹面摘出脑垂体, 放在 Bouin-Holland 和新配制 Bouin 液中固定 4~8h, 梯度酒精脱水, 石蜡包埋, 切片厚度 3~4 μ m, 用于脑垂体组织生理学 and 免疫组织化学研究。

1.3 脑垂体组织学染色

用 Heidenhain-Azan 法, 对脑垂体不同类型细胞进行分类, 确定脑垂体促性腺激素分泌细胞的分布位置。同时, 用目微尺计算 2.5mm², 实验组和对照组性腺未早熟和早熟脑垂体 GtH 细胞胞质的空泡数, 作为判断 GtH 细胞分泌活动的指标。

1.4 免疫组织化学反应程序

脑垂体切片脱水后, 放入含 3% H₂O₂ 蒸馏水溶液 20min, 除去内源性过氧化物酶的活性, 然后分别按 SABC(抗生物素-生物素-过氧化物酶复合物)进行免疫组织化学反应。第一抗体分别为兔抗鲑鱼促性腺激素抗体^[3], 工作浓度为 1:400; GnRH 抗独特型抗体(GnRH 受体, GnRHR, 由西安第四军医大学组织胚胎教研室制备, 并已通过鉴定^[4]), 工作浓度为 1:100。在 4℃ 孵育 24h, PBS 中洗 3 次, 每次 5min, 然后加生物素标记羊抗兔 IgG 抗体(1:50 稀释), 在室温下孵育 30min, 后加 SABC 复合物(武汉博士德生物工程股份有限公司出品), 在室温下孵育 30~40min, 最后用 3', 3'-二氨基联苯胺(DAB)显色 10~30min。对照片用正常兔血清或 PBS 替代第一抗体进行孵育, 结果为阴性。

2 结果

2.1 促性腺激素分泌细胞在脑垂体的分布

Heidenhain-Azan 组织学染色结果表明, 大黄鱼脑垂体, 像其它硬骨鱼脑垂体一样, 也是由神经垂体和腺垂体所组成。腺垂体可进一步分为三部分, 前外侧部(Rostral pars distalis, RPD), 位于脑垂体背面; 中外侧部(Proximal pars distalis, PPD), 以前称为间叶, 位于第三脑室基部并延伸至腹面; 垂体中间部(Pars intermedia, PI) 以前称为过渡叶(图版 iv-1)。促性腺激素分泌细胞被 H-A 染为蓝色, 位于这三个部或叶外

侧边缘,细胞为椭圆形或不规则形,在高倍显微镜下,可见胞质中有细的分泌颗粒(图版 iv-2),被苯胺蓝染色成蓝色,胞径 $9.52 \pm 1.04 \mu\text{m}$ ($7.59 \sim 10.81 \mu\text{m}$),核居中,核内有 1~3 个染色质颗粒,被 Azan 染为红色。核径 $4.55 \pm 0.23 \mu\text{m}$ ($4.14 \sim 5.05 \mu\text{m}$)。同时,在对照组性早熟大黄鱼垂体中外侧部可见许多促性腺激素分泌细胞处在分泌活动时期,这些细胞胞质均出现空泡,可视为释放分泌颗粒的证据。而实验组未早熟垂体仅见一些 GtH 细胞胞质出现空泡。我们统计和对比雌雄大黄鱼服用 GnRH-A 实验组性腺未见早熟和对照组性早熟脑垂体前外侧部和中外侧部 GtH 细胞胞质空泡的数量,发现它们之间有显著的不同(表 1),实验组空泡数量比对照组少 1 倍以上,经统计学处理,差异十分显著($P < 0.01$),提示大黄鱼性早熟可能与脑垂体促性腺激素分泌细胞处于旺盛分泌活动时期有关。另外,鲑鱼 GtH 抗体免疫组织化学定位的结果还看出,对照组性早熟大黄鱼脑垂体 GtH 细胞分布范围明显的大于实验组未早熟大黄鱼(图版 iv-3,4),除说明早熟鱼脑垂体进入发育成熟期外,并进一步证明 H-A 染色所见大黄鱼 GtH 细胞在脑垂体分布的可靠性。此外,实验组和对照组大黄鱼的生长速度也有不同。根据取样检查的结果,实验组喂含 GnRH A,平均体重为 $197.10 \pm 60.8\text{g}$,喂含紫萁为 $170.66 \pm 41.7\text{g}$,对照组为 $157.50 \pm 42.5\text{g}$ 。

表 1 实验组和对照组大黄鱼脑垂体 GtH 细胞胞质空泡的数量

Tab. 1 The amount of vacuole in the cytoplasm of pituitary GtH cell in the experimental and control groups of large yellow croaker

组别	动物数量	性别	性腺发育时期	脑垂体 GtH 细胞空泡数
实验组	10	雌性	⑤	10.5 ± 1.13
对照组	10	雌性	④-⑤	29.0 ± 5.09
实验组	10	雌性	④-⑤	11.2 ± 1.31
对照组	10	雌性	⑤	28.0 ± 4.61

2.2 GnRH 受体免疫组织化学定位

研究结果表明,实验组未早熟和对照组早熟大黄鱼脑垂体中外侧部 GtH 细胞对 GnRH 抗独特型抗体发生弱或强的不同免疫阳性反应,受体阳性物定位在胞膜上。进一步分析对比实验组(连续服用 GnRH-A 和对照组(未服用)GtH 细胞对 GnRH 抗独特型抗体的免疫反应的差别,结果发现服 GnRH-A 大黄鱼脑垂体 GtH 细胞对抗独特型抗体免疫阳性比对照明显的减弱(图版 iv-5),而对照组 GtH 细胞则呈强的免疫阳性,显棕褐色(图版 iv-6)。这些不同反应,提示长期服用 GnRH-A 大黄鱼脑垂体 GtH 细胞对 GnRH 的敏感性显著的下降,即出现脱敏效应(desensitization effect)。紫萁组的大黄鱼脑垂体 GtH 细胞对 GnRH 抗独特型抗体的免疫阳性反应与对照组没有明显的差异,表明紫萁抑制大黄鱼性早熟可能不是直接对 GtH 细胞起作用。

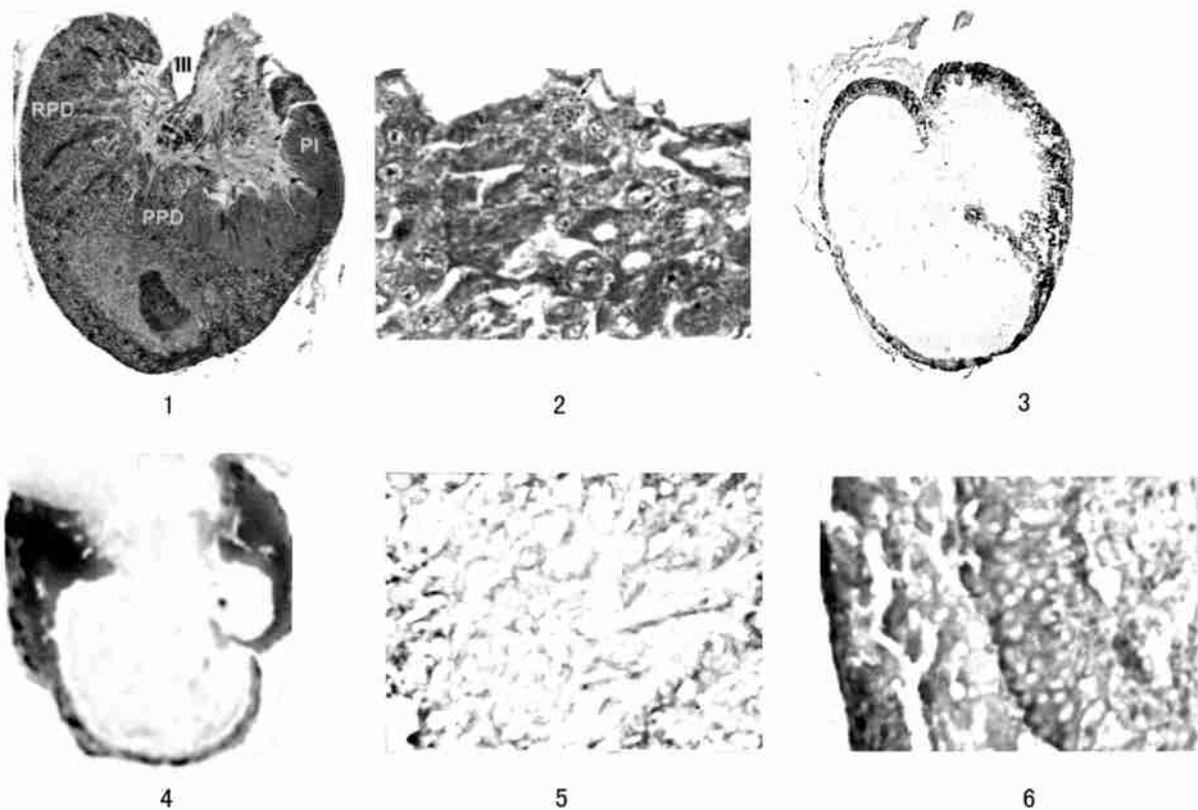
3 讨论

鱼类生殖内分泌的研究证实^[6],鱼类性腺发育和成熟是受下丘脑-脑垂体-性腺轴的调控。现已明确鱼类脑内存在 GnRH 神经系统^[6],分泌 GnRH 刺激脑垂体释放促性腺激素,直接激发性腺(卵巢和精巢)的发育和成熟。本研究结果看出,性早熟雌雄大黄鱼脑垂体促性腺激素分泌细胞进入分泌活动时期,其标志是:(1)有许多 GtH 细胞胞质出现空泡,而未成熟鱼的脑垂体 GtH 细胞大多数仍处于静止活动时期,胞质存在大量分泌颗粒,空泡数量减少;(2)免疫组织化学定位结果显示,未成熟鱼脑垂体 GtH 细胞分布范围较小,而成熟鱼的分布范围广,这些事实有力地说明大黄鱼性早熟是由于 GtH 细胞提早成熟并进入分泌活动所致,其证据是我们以前在罗非鱼脑垂体组织生理学研究中业已证实,GtH 细胞胞质中的空泡可作为其分泌活动的标志,以及在促性腺激素分泌细胞超微结构研究中进一步证实组织生理学观察的可靠性^[7,8]。后来,周寿康等^[9,10]在大鼠脑垂体促性腺激素分泌细胞周期性变化研究中,证实我们在鱼类 GtH 细胞分泌颗粒释放后出现这种空泡,他们还进一步分析观察这种空泡或称液泡的系

统变化过程及其生理意义。因此,性早熟大黄鱼 GtH 细胞的分泌活动特点与罗非鱼和哺乳类相一致。同时,免疫组织化学定位的结果还揭示,长期服用 GnRH-A 的大黄鱼脑垂体促性腺激素分泌细胞膜上 GnRH 受体对 GnRH-A 的敏感性明显下降,即出现脱敏效应。这与 Peter^[11]在鱼类,Smith 和 Conn^[12]在大鼠均发现这两种动物长期接受 GnRH-A 或接受超活性 GnRH 类似物都能诱发动脑垂体促性腺激素分泌细胞发生脱敏效应,对 GnRH 失去应答反应,本研究出现的现象与此类似,这就意味着大黄鱼 GtH 细胞对外源性 GnRH-A,不能诱发其应答反应,即不能或使其释放促性腺激素的效率十分显著的下降,换言之,阻断 GtH 细胞正常的分泌活动。我们认为,GnRH-A 抑制大黄鱼性早熟的机制可能与此有关。当然,并不排除 GnRH-A 通过垂体外作用,可能对性腺也有抑制作用^[13]。至于紫萁抑制大黄鱼性早熟的机制,可能较为复杂,这是因为紫萁是一种从低等植物提取的活性物质,成分复杂,它影响大黄鱼的性早熟可能通过多种途径起作用,我们推测是影响脑内多巴胺系统来抑制大黄鱼性早熟,因为我们已研究证实紫萁对脑垂体促性腺激素分泌细胞膜上 GnRH 受体的敏感性没有任何影响,这就排除紫萁对脑垂体的直接抑制作用,确切证据仍有待进一步研究。我们还认为大黄鱼性早熟的原因十分复杂,不排除环境中某种因子或是饵料中含有某种物质诱发大黄鱼性早熟,这一问题将进一步分析研究,可能也是诱发性早熟的一个重要因素,将在另文发表。

参考文献:

- [1] 方永强,翁幼竹,周 晶,等. 大黄鱼性早熟问题的研究 iv. 网箱养殖鱼性腺发育状况[J]. 台湾海峡, 2000, 19(3): 354- 359.
- [2] 方永强,翁幼竹,周 晶,等. 大黄鱼性早熟问题的研究 ⑤. 不同药物对性早熟的影响[J]. 台湾海峡, 2000, 19(4): 494- 498.
- [3] Kobayahi M, Aida K, Sakai K, et al. Radioimmunoassay for salmon gonadotropin[J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1987, 53: 995- 1003.
- [4] 黄威权,张崇理,孙 岚. GnRH 抗独特型抗体的制备与鉴定[J]. 解剖学杂志, 1994, 17(增刊): 353.
- [5] Lin H R, Peter R E. Hormones and spawning in fish [J]. Asian Fisheries Science, 1996, 9: 21- 33.
- [6] Kah O. A re-investigation of the GnRH (gonadotropin-releasing hormones) system in the goldfish brain using antibodies to salmon GnRH[J]. Cell Tissue Res. 1986, 244: 327- 337.
- [7] 方永强. 丘脑下部促黄体素释放激素类似物(LRH-A)的作用机制 iv. 脑垂体组织生理学的研究[J]. 动物学报, 1981, 27(3): 203- 206.
- [8] 方永强,汪 敏. 丘脑下部促黄体素释放激素类似物(LRH-A)的作用机制 ⑤. 对罗非鱼脑垂体促性腺激素分泌细胞的影响[J]. 动物学报, 1983, 29: 124- 127.
- [9] 周寿康,谢衷明. 大鼠动情周期垂体促性腺细胞周期性变化的定量免疫细胞化学研究[J]. 生理学报, 1988, 40(5): 436.
- [10] 周寿康,戴茂征,谢衷明,等. 大白鼠促性腺激素细胞分泌周期中颗粒和液泡结构的周期性变化[J]. 生殖与避孕, 1990, 10: 18- 23.
- [11] Peter R E. Zool[C]. AN J. 1980, 58: 1100- 1104.
- [12] Smith W A, Conn M. Microaggregation of the gonadotropin-releasing hormone-receptor: relation to gonadotrope desensitization [J]. Endocrinology, 1984, 114: 553- 559.
- [13] Hsueh A J W, Jones P B C. Gonadotropin releasing hormone: extrapituitary actions and paracrine control mechanisms [J]. Ann Rev Physiol, 1983, 45: 83- 94.



- 1 正常大黄鱼脑垂体(pituitary gland of large yellow croaker) RPD: 前外侧部: PPD: 中外侧部: PI: 中间部×80
- 2 实验组大黄鱼脑垂体纵切面, H. A 染色, 促性腺激素分泌细胞胞质中分泌颗粒(箭头) × 1200(Longitudinal section of pituitary in the experimental group. H. A staining. The secretory granules (arrow) of gonadotropic cell)
- 3 实验组未成熟大黄鱼脑垂体促性腺激素分泌细胞的免疫组织化学定位. × 80(Immunohistochemical localiztion of gonadotropic cell in the pituitary gland of immature fish in the experimental group)
- 4 对照组成熟大黄鱼脑垂体促性腺激素分泌细胞的免疫组织化学定位. × 80(Immunohistochemical localization of gonadotropic cell of pituitary gland of mature fish in the control group)
- 5 实验组未成熟雌性大黄鱼脑垂体 GnH 细胞对抗独特型抗体显示弱的免疫阳性反应. × 120(In experimental group, GnH cells of immature pituitay in large yellow croaker shows weak immunopositive reaction to GnRH anti- idiotypic antibodies)
- 6 对照组雌性成熟大黄鱼脑垂体 GnH 细胞对 GnRH 抗独特型抗体显示强的免疫阳性反应. × 120(In control group, GnH cell of mature pituitary in large yellow croaker showed strong immunopositive reaction to GnRH anti- idiotypic antibodies)