

GnRH对虎纹蛙 LH和 FSH分泌活动的调节作用^{*}

李远友 林浩然

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要 通过在体和离体实验,研究了 mGnRH和 cGnRH-II 对生殖前期虎纹蛙垂体 LH及 FSH的合成与分泌的影响.结果表明:在体条件下, mGnRH和 cGnRH-II 都能极显著刺激♂蛙和♀蛙垂体 LH及 FSH的释放,也能显著升高♀蛙垂体 LH的含量,但对♂蛙垂体 LH及 FSH的含量无明显影响; cGnRH-II 能极显著升高♀蛙垂体 FSH的含量.在刺激♀蛙垂体 LH的合成、释放以及♂蛙垂体 FSH的释放方面, mGnRH的作用显著强于 cGnRH-II.离体实验中, 0.1 ng/mL的 mGnRH和 1 ng/mL的 cGnRH-II 都能极显著刺激离体♀蛙垂体碎片 LH的释放.

关键词 促性腺激素释放激素, 促黄体激素, 卵泡刺激素, 虎纹蛙

分类号 Q 453

在脊椎动物中,促性腺激素释放激素 (GnRH) 是垂体促性腺激素 (GtH) 合成和释放的主要调节者,它在生殖功能的神经激素调控中起关键作用.到目前为止,从高效液相色谱分析、放射免疫分析和免疫组织细胞化学分析的研究结果来看,一般认为在蛙类存在的 GnRH为哺乳类 GnRH(mGnRH)和鸡II GnRH(cGnRH-II).关于这2种 GnRH在蛙类垂体促性腺活动中的作用,已有的报道多是通过研究它们在不同脑区的分布来确定的:即主要分布在脑的视前-下丘脑正中隆起区的 GnRH,被认为与垂体促性腺活动的控制有关;而主要分布在其它脑区的 GnRH,则被认为在中枢神经系统中起神经传递和(或)神经调节的作用^[1].到目前为止,有3种不同的观点:① mGnRH控制垂体的促性腺活动^[2];② cGnRH-II 控制垂体的促性腺活动^[3,4];③ mGnRH和 cGnRH-II 都参与垂体促性腺活动的直接调节^[5,6].

虎纹蛙 (*Rana rugulosa*) 是我国二级保护动物,对其增殖和养殖技术的研究很有必要.为此,本文通过在体和离体实验,从生理学的角度,研究 mGnRH和 cGnRH-II 对虎纹蛙2种 GtH(即卵泡刺激素 FSH和促黄体激素 LH)分泌活动的调节作用,以便在理论上为不同类型 GnRH在蛙类垂体促性腺活动中的作用提供新的证据,在生产上为蛙类催产剂的研制及其人工繁殖提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 实验动物

生殖前期(性腺发育接近成熟)的虎纹蛙成蛙于1997年3月中下旬购自广州市农贸市场,

* 收稿日期: 1997-12-22 李远友,男,34岁,博士,现在汕头大学科学研究院工作

身体质量 55~ 98 g, 性腺成熟系数 (GSI): 雌蛙 $5.39 \pm 2.33\%$, 雄蛙 $0.4 \pm 0.13\%$. 实验前暂养于室内水泥池中 1 周.

1.2 实验设计与方法

1.2.1 在体实验 雌雄蛙各分 3 组, 每组 6~ 10 只. 对照组每只注射蛙用生理盐水 0.2 mL, 实验组每只注射 0.2 mL mGnRH (Sigma 公司) 或 cGnRHII (香港大学动物学系 Yu 博士赠送) 溶液. 先将它们用 0.1 mol/L HAc 溶解, 再以生理盐水稀释成 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$, 注射部位为背淋巴囊. 在注射后 20~ 30 min, 用乙醚将蛙轻度麻醉, 称量, 然后从心脏取血. 把血液移入预先加有 $10 \mu\text{L}$ 抑蛋白酶肽 (aprotinin, Sigma 公司, λ 为 $1.66 \times 10^5 \text{ mol s}^{-1} \text{ mL}^{-1}$, 0.01 mol/L PBS) 并半埋于碎冰中的离心管内, 冰箱中 4°C 下静置 1~ 3 h 后, $15\,000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 3~ 5 min, 血浆倒入另一离心管中, 加微量 (0.5~ $1 \mu\text{L}$) $d = 0.1\%$ 的硫柳汞 (thimerosal) 防腐, 置 -20°C 冰箱中保存, 待测 LH 和 FSH 含量. 将取过血的蛙迅速沿枕骨大孔处用断头法处死, 打开颅腔, 取出垂体并放入 1.5 mL 离心管中, 置 -20°C 冰箱中保存. 测定前, 加 1 mL 约 4°C 的测定缓冲液将垂体用超声波匀浆器匀浆, 匀浆液直接用于 LH 和 FSH 含量的测定.

1.2.2 离体实验 用断头法将♀蛙处死后, 按上述方法取出垂体, 迅速放入冰浴玻璃培养皿内的培育介质 (HHBS Hepes 缓冲的 Hanks 平衡盐溶液, pH 7.2, 含 $d = 0.1\%$ 的 BSA, $50 \mu\text{mol}/\text{L}$ 杆菌肽 (bacitracin, Sigma 公司)) 中. 更换 2 次 HHBS 以清洗垂体, 仔细将垂体切成约 $200 \mu\text{m}$ 大小的碎片. 将垂体碎片转入 24 孔培养板的小孔内, 每小孔内置 1 mL HHBS, 内含 4 个垂体的碎片, 每组设 4 个重复. 培育前, 用滴管更换每孔内的 HHBS 3 次, 同时冲洗垂体碎片. 进行 45 min 的预培育后, 把培育过的 HHBS 吸走, 每孔换上 1 mL 新的 HHBS (对照组) 或 1 mL 含不同浓度 GnRH 的 HHBS (处理组). 在 $(24 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 下, 对照组和处理组的培育时间都为 30 min. GnRH 处理浓度从低到高, 在每次处理之间, 用 1 mL 新的 HHBS 洗垂体碎片 30 min. 将培育液吸入 1.5 mL 离心管中, 放入 -20°C 冰箱中保存, 待测 LH 和 FSH 含量.

1.2.3 样品测定及数据处理 样品 LH 和 FSH 含量测定采用特异性的牛蛙 LH 和 FSH 放射免疫测定法 (RIA). LH 和 FSH 的标准品及抗血浆由日本 Waseda 大学生物学系 Ishii 博士提供. 在 LH 或 FSH 的 RIA 中, LH 或 FSH 与垂体中的其它肽类均无交叉反应或交叉反应很小, LH 与 FSH 之间的交叉反应小于 1% [17]. 数据以平均值 \pm 标准差表示. 用 Duncan 氏新复极差检验各组间 LH 和 FSH 含量的差异. $P < 0.05$ 认为差异显著, $P < 0.01$ 认为差异极显著.

2 结果与讨论

2.1 在体注射 mGnRH 和 cGnRHII 对虎纹蛙血浆 LH 及 FSH 水平的影响

与对照组相比, mGnRH 和 cGnRHII 都能极显著刺激♀蛙与♂蛙血浆 LH 及 FSH 水平升高, 说明 2 种 GnRH 都能极显著刺激♀、♂ 虎纹蛙垂体 LH 和 FSH 的释放 (图 1a). 但是, 2 种 GnRH 的作用仍存在有一定的差异性: 在刺激♀蛙血浆 LH 水平及♂蛙血浆 FSH 水平升高方面, mGnRH 的作用显著强于 cGnRHII; 对♂蛙血浆 LH 水平及♀蛙血浆 FSH 水平升高的作用, 两者无显著差异. 蛙类和其它脊椎动物一样, 其性腺的最后发育成熟和排卵排精需要有较高的血浆 GtH 水平. 除生理生态条件外, 通过人工催产提高动物体血浆 GtH

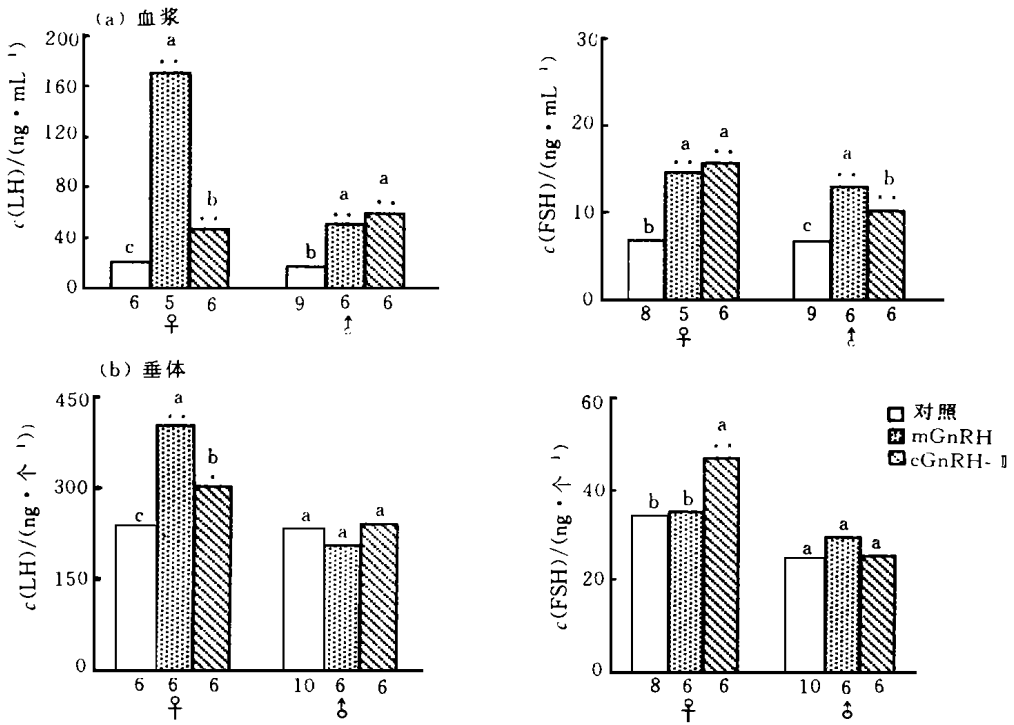


图 1 在体注射 mGnRH 和 cGnRHII 对虎纹蛙血浆 (a) 和垂体 (b) LH 及 FSH 水平的影响

Fig. 1 Effects of mGnRH and cGnRHII on LH and FSH levels of plasma (a) and pituitary (b) of *Rana rugulosa* in vivo

字母不同表示相互间差异显著, * 和 ** 分别表示与对照差异显著和极显著. 柱下数字表示每组实验蛙数

水平主要有 2 条途径: 一是直接给动物体补充外源性的 GnRH (如注射垂体匀浆液、人绒毛膜促性腺激素); 二是通过向动物体注射 GnRH, 以刺激垂体内源性的 GnRH 的合成和释放. 本研究选用性腺发育接近成熟的虎纹蛙进行实验, 目的之一是为蛙类人工催产提供理论依据. LH 是蛙类排卵所需要的基本的 (如果不是唯一的) 垂体激素^[8]. 因此, 在选用 GnRH 作为催产剂时, 主要是看它对 ♀ 蛙垂体 LH 的合成和释放的刺激作用如何, 而它对 FSH 的影响以及它对 ♂ 蛙 LH 的作用则不是主要的. 因为, 在蛙类的一些研究表明, GnRH 对 LH 和 FSH 的分泌都有刺激作用^[9], 在 GnRH 影响 LH 的分泌时, FSH 也很可能受到了影响; 而雄蛙一般都能较好地正常发育成熟. 本研究的结果表明, 尽管 mGnRH 和 cGnRHII 都能极显著刺激 ♀ 蛙和 ♂ 蛙血浆 LH 及 FSH 水平升高, 但两者相比, mGnRH 的作用显著强于 cGnRHII. 因此, 在研制虎纹蛙的催产剂时, mGnRH 可作为其首选的对象之一.

2.2 在体注射 mGnRH 和 cGnRHII 对虎纹蛙垂体 LH 及 FSH 含量的影响

实验结果见图 1b. 与对照组相比, mGnRH 能使 ♀ 蛙垂体 LH 含量极显著升高; cGnRHII 能使 ♀ 蛙垂体 LH 含量显著升高, 它也能使 ♀ 蛙垂体 FSH 含量极显著升高, 种 GnRH 对 ♂ 蛙垂体 LH 及 FSH 含量都无明显的影响. 比较对照组和实验组蛙血浆与垂体的 LH 及 FSH 含量可以发现: 受 mGnRH 和 cGnRHII 的作用, ♀ 蛙和 ♂ 蛙垂体 LH 及 FSH 的合成与释放作用都显著加强, 因而其血浆 LH 及 FSH 水平都显著升高. 从 GnRH 对 ♀ 蛙垂体

LH含量的影响来看,本结果和上述 GnRH对血浆 LH水平的影响的结果一致,也是 mGnRH的作用显著强于 cGnRH-II。

2.3 mGnRH和 cGnRH-II 对虎纹蛙雌蛙离体垂体碎片 LH释放的影响

图 2表明与对照组相比, mGnRH在 0.1 ng/mL下能极显著刺激虎纹蛙雌蛙离体垂体碎片 LH的释放,当 mGnRH为 1 ng/mL时, LH的释放没有受到明显的影响; cGnRH-II 在 0.1 ng/mL下,对 LH释放无明显影响,在 1 ng/mL下极显著刺激 LH释放。

离体实验结果与在体实验结果都一致地说明, mGnRH和 cGnRH-II 都能极显著刺激虎纹蛙垂体 LH的释放。离体实验中,从 2种 GnRH的作用剂量来看, mGnRH刺激 LH释放的活性约比 cGnRH-II 大 10倍;也就是说,与 cGnRH-II 相比,垂体对 mGnRH的作用更为敏感。用 1 ng/mL的 mGnRH孵育垂体碎片,其 LH的释放与对照没有显著差异,这可能是垂体对 GnRH的敏感性降低或“脱敏”作用的结果。在哺乳类,垂体受高剂量 GnRH长时间的或持续性刺激,或引入高频率的 GnRH脉冲式刺激都可迅速导致其 GtH分泌细胞对进一步的 GnRH刺激的敏感性降低或不敏感(即脱敏)。在牛蛙进行的 GnRH类似物的注射实验中,垂体也表现出和哺乳类一样的“脱敏”现象^[10]。

本研究首次从生理学的角度证明 mGnRH和 cGnRH-II 都能显著刺激生殖前期虎纹蛙垂体 LH及 FSH的合成与释放,这支持蛙类“mGnRH和 cGnRH-II 都参与垂体促性腺活动的直接调节”的观点;同时也表明,在刺激生殖前期虎纹蛙雌蛙垂体 LH的形成和分泌方面, mGnRH的作用显著强于 cGnRH-II,所以在生产上可选用人工合成的 mGnRH(即 LHRH)或其类似物,作为虎纹蛙(甚至其它蛙类)人工繁殖的催产剂之一。

参 考 文 献

- 1 Sherwood N M, Lovejoy D A, Coe I R. Origin of mammalian gonadotropin-releasing hormone. *Endocr Res*, 1993, 14: 241~ 254
- 2 King J A, Steneveld A A, Millar R P. Differential regional distribution of gonadotropin-releasing hormones in amphibian (clawed toad, *Xenopus laevis*) brain. *Regul Pept*, 1994, 50: 277~ 289
- 3 Conlon J M, Collin F, Chiang Y C, et al. Two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone from the brain of the frog, *Rana ridibunda*: purification, characterization, and distribution. *Endocrinology*, 1993, 132: 2117~ 2123
- 4 Fasano S, Goos H J Th, Janssen C, et al. Two GnRHs fluctuate in correlation with androgen levels in the male frog *Rana esculenta*. *J Exp Zool*, 1993, 266: 277~ 283
- 5 Iela L, Powell J F F, Sherwood N M, et al. Reproduction in Mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor* (VI). Presence and distribution of multiple GnRH forms in the brain. *Gen Comp Endocr*,

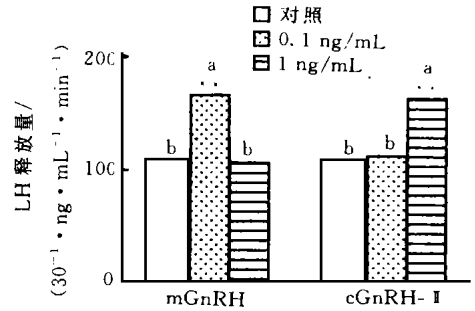


图 2 mGnRH和 cGnRH-II 对虎纹蛙雌蛙离体垂体碎片 LH释放的影响(说明同图 1)

Fig. 2 Effects of mGnRH and cGnRH-II on LH release from pituitary fragments of female *Rana rugulosa* in vitro

- 1996, 103: 235~ 243
- 6 Licht P, Tsai P S, Sotowska-Brochocka J. The nature and distribution of gonadotropin-releasing hormones in brain and plasma of ranid frogs. *Gen Comp Endocr*, 1994, 94: 186~ 198
 - 7 Daniels E L, Licht P, Farmer S W, et al. Immunochemical studies on the pituitary gonadotropins (FSH and LH) from the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen Comp Endocr*, 1977, 32: 146~ 157
 - 8 Licht P. Reproductive endocrinology of reptiles and amphibians. *Annu Rev Physiol*, 1979, 41: 337~ 351
 - 9 Licht P, Porter D A. Role of gonadotropin-releasing hormone in regulation of gonadotropin secretion from amphibian and reptilian pituitaries. In: Norris D, Jones R E, eds. *Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians and Reptiles*. New York: Plenum, 1986. 61~ 85
 - 10 McCreery B R, Licht P, Barnes R, et al. Actions of agonistic and antagonistic analogs of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen Comp Endocr*, 1982, 46: 511~ 520

Regulation of GnRH on LH and FSH Secretion of *Rana rugulosa*

Li Yuanyou* Lin Haoran

Abstract The effects of mGnRH and cGnRH^{II} on the synthesis and secretion of LH and FSH of pituitary of *Rana rugulosa* during pre-breeding stage were studied *in vivo* and *in vitro*. *In vivo* both mGnRH and cGnRH^{II} very significantly stimulated the release of LH and FSH from the pituitary of female and male. They also significantly elevated the LH levels of pituitary of female, but had no notable effects on LH or FSH content of pituitary of male. The FSH content of pituitary of female was also very significantly elevated by cGnRH^{II}. mGnRH was more effective than cGnRH^{II} in stimulating the LH synthesis and release of pituitary of female, or the FSH release of pituitary of male. *In vitro* both mGnRH at the dose of 0.1 ng/mL and cGnRH^{II} at the dose of 1 ng/mL very remarkably stimulated LH release from the incubated pituitary fragments of female.

Keywords gonadotropin-releasing hormone, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, *Rana rugulosa* W.

* School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China