

促黄体释放激素(LRH)类似物 在鲢鱼的免疫反应的研究

童青松* 苑省三 张素雅 刘学高

家鱼人工繁殖,多年来使用鲤鱼或鲢鱼垂体及人类绒毛膜促性腺激素(HCG)进行催产。目前这些催产剂除供不应求外,尚发现有某些免疫反应⁽⁷⁾。我国新合成了一种LRH类似物激素,自1975年开始应用,已取得了一定效果。其优点为,可以大量合成,能满足日益发展的生产需要,因为其分子量仅1167,是含有一个酪氨酸的九肽小分子化合物,为半抗原性质,抗原性较低。但在推广这一新激素的同时,尚有必要进一步对LRH类似物的抗原性问题进行研究。

另一方面,有关鱼类的免疫机制的研究报导,主要集中在一些海水鱼类⁽²⁾,所以我们同时对鲢鱼免疫反应的机制,进行了一些探讨。

实验方法及结果

1、抗LRH类似物血清的制备

1、家兔抗LRH类似物抗血清(为阳性对照)的制备:选雄兔4只,平均体重3斤左右,进行免疫。将抗原溶液用福氏完全佐剂乳化后注射。LRH类似物为上海生化所供应,用注射器法⁽³⁾配制成含100微克/毫升的抗原乳化液。

一次免疫,皮下分4—5次注射50微克/斤,于注射后16天分别在不同时间采血分离血清,混合后以被动血凝集试验⁽⁶⁾测定抗体滴度。

2、LRH类似物对鲢鱼的免疫:鲢鱼为本校农场供应,选亲鱼26尾,平均体重1斤左右,性腺发育近IV期初,精养一个月后开始实验。同上法配制抗原乳化液并进行免疫。

免疫方法⁽⁴⁾,基础免疫两次:第一次每尾腹腔注射0.3—0.4毫升(含LRH类似物30—40微克);隔日第二次腹腔注射150微克/0.3毫升/尾。隔10日后连续强化两次,亦为腹腔注射,每次30微克/0.3毫升。注射后分别于13、15、19、32、40、46天各随机取样3—5尾,心脏采血,分离血清混合后进行实验。每次同时对

*童青松、苑省三是1974届学员。

LRH类似物完全佐剂免疫的家兔及正常家兔、正常鲮鱼进行对照。

2、鲮鱼免疫后产生抗体水平的测定

采用被动血凝聚法^[6]，是用家兔红细胞制备1%的LRH类似物包被细胞，结果见图1。

从图1可见，鲮鱼在免疫32天后，抗体滴度最高达320，家兔免疫45天后，抗体最高滴度为1280。而对照组的鲮鱼及家兔未测到可见的抗体。

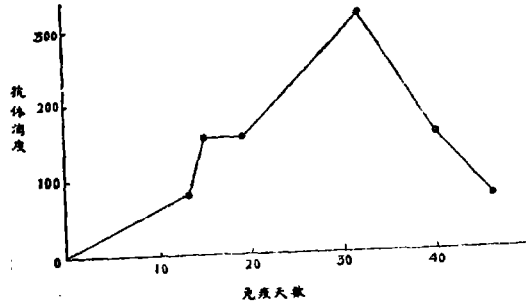


图1 LRH类似物完全佐剂免疫鲮鱼产生抗体的水平

3、LRH类似物免疫后鲮鱼性腺发育的变化

实验开始时，未免疫正常鲮鱼的性腺一般为IV期初卵，经免疫19天一般仍为IV期卵，免疫19天后在取样的四尾中有两尾出现性腺退化及血球比容量下降的现象；而免疫后32、40、46天取样中，全部出现性腺退化现象，其中32、40天取样抽血时各出现一尾血容量很低（家兔也同样出现免疫后50天血球比容量的下降，血液呈粉红色）。免疫32天后8尾雌性鲮鱼中成熟系数为9.5%，性腺都有退化，最高退化卵占20%（雄性的一般成熟系数在1%以下）。而对照组雌鱼的成熟系数最低为10%以上，最高可达16.8%，而且无卵粒的退化现象。可能说明LRH类似物的剂量过高，对性腺有抑制作用。这与文献报导对小白鼠和花白鲢的实验出现有同样的现象^[6,7]。

4、鲮鱼抗LRH类似物免疫球蛋白的定性

① 圆盘电泳^[8]与被动血凝法复合分析：

每一样品电泳二管，其中一条凝胶条经氨基黑10B染色，区带按人血清的分区法命名。另一凝胶条按染色的凝胶条的区带定位切下各区段，每段分别放入含有0.5毫升正常灭活兔血清稀释液的小试管中，然后加入0.1毫升LRH类似物包被细胞，进行反应3小时观察结果（鱼类抗体在贮存期间容易分解，一般采用新鲜血清效果较好）。对照组为切下空白凝胶条同上进行实验。结果见表1。

在我们的六次实验中（共18尾），都在 γ 区有对LRH类似物包被细胞产生凝集反应，说明 γ 位有特异性抗体的存在。而在 α 与A（白蛋白）区出现的微量凝集反应属可疑反应。32天的样品中抗体滴度最高的抗血清，在 γ 区的凝集反应也最强。初步认为鲮鱼有 γ 位免疫球蛋白的存在。

关于血清因子问题，正常鱼类血清中存在着引起异种动物血球溶血的溶血素及

表 1 分区被动血凝反应

次数	免疫天数	血清	区 段				
			γ	β	α	A	空白
1	13	抗血清 (三尾混合)	+	-	±	-	-
2	15	"	+	-	+	-	-
3	19	"	+	-	-	±	-
4	32	"	+++	-	+	±	-
5	40	"	+	-	-	-	-
6	46	"	±	-	-	-	-
		正常血清	-	-	-	-	-

说明：“±”表示微量凝集反应可疑阳性。
 “+→+++”表示不同程度的典型的血凝反应。
 “-”表示无凝集反应。

凝集素，它与免疫后产生的特异性抗体的区别在于前者滴度低^(4-8,11,12)。因此前者在我们的被动血凝实验中，只在抗血清稀释度为1:10、1:20的试管中可见有溶血现象，其他各管随着稀释度的增加而不显著。

关于免疫过程出现血球比容下降的现象，据报导在其他动物如豚鼠用激素抗原（胰岛素）免疫后也出现血球比容下降的现象。经实验证明其血液主要集中到肝、肾与脾内⁽⁸⁾。免疫后的家兔或鲮鱼，其注射局部都出现炎症反应。

② 鲮鱼抗LRH类似物血清的放射免疫圆盘电泳定性分析：

先将¹²⁵I-LRH类似物与抗LRH类似物抗体在点样时混合作用数分钟，形成的抗原——抗体复合物，在电场中基本不再泳动。而未经结合的¹²⁵I-LRH类似物与无特异性的其他血清蛋白继续泳动至凝胶的各部位。然后按 $\gamma\beta\alpha$ 与A各区带连同凝胶条外面的塑料管一起剪下，在FT-603井形闪烁计数器（二六一厂）、FH-408自动定标器中分别测定各区带的放射性，结合率高者，表示有特异性结合（即抗原——抗体复合物所在）。

¹²⁵I-LRH类似物的标记：本实验所用之¹²⁵I-LRH类似物为北京动物所与本系中心实验室按氯胺-T微量蛋白标记法⁽¹³⁾共同标记的。圆盘电泳的聚丙烯酰胺凝胶是装入0.4×8厘米的乳白聚乙烯塑料管内，每管约装1毫升左右。

点样：鲮鱼抗LRH类似物抗体稀释液(1:1000)50微升加¹²⁵I-LRH类似物20微升(约含0.014微克LRH类似物，放射性计数为959676—960294/分)，加饱和蔗糖液两滴。同样点样两管，一管为未标记的LRH类似物，做为染色后定位对照。正

常对照以兔血清稀释液,其他同上。

电泳:每管4mA,电泳40分钟后取出。未标记LRH类似物凝胶条进行氨基黑10B染色,其他则按染色部位将 γ · β · α 与A各区连同塑料管一起分别剪断,末尾空白处同样剪下为空白对照。

将以上剪断的各段分别放入一小试管内,置井形闪烁计数器中测定放射性。结果列入图2。

由图2可看出有三个结合高峰, γ 、 α 与白蛋白区。说明鲮鱼的抗LRH类似物的特异性抗体有 γ —位免疫球蛋白,可能有 α 区免疫球蛋白与白蛋白区的免疫特异组分存在。

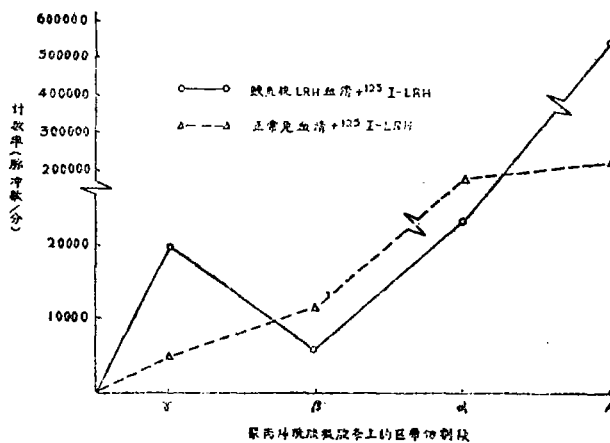


图2 鲮鱼抗LRH血清的放射免疫圆盘电泳定性分析

③ 鲮鱼在免疫过程中抗LRH血清成分变化的定量:

这项实验是参考氨基黑洗脱比色法^[16],将抗血清经圆盘电泳分离后,经氨基黑染色的凝胶条按各区带切下,洗脱,在分光光度计波长620毫微米下进行定量。

结果:鲮鱼经免疫后 γ -球蛋白有显著的升高,而白蛋白则下降。见表2及图3。

表2 鲮鱼LRH类似物免疫后血清 γ 球蛋白量的变化

	动物数	聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳后 γ 区带洗脱氨基黑的O.D.	标准误(SX)	两组相差显著性测验(P值)
免疫鲮鱼	9	0.0681	0.010	0.05 > P > 0.01 相差显著
对照鲮鱼	3	0.0256	0.016	

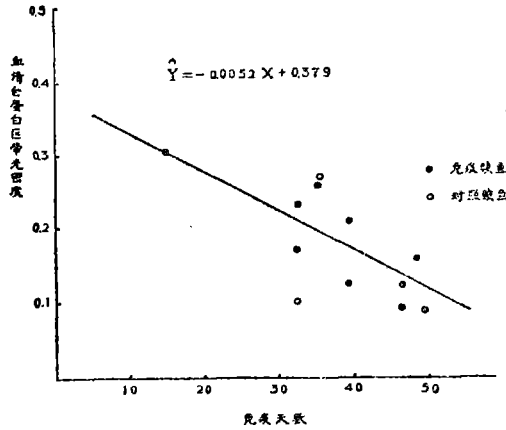


图 3 鲮鱼LRH类似物免疫后血清白蛋白含量的变化

讨 论

1、关于LRH类似物的抗原性问题

在隔日连续注射生理盐水配制的LRH类似物(含30微克/斤)18次45天的花白鲢,基本未测得可见的抗体水平,但注射15次30天左右,开始出现性腺退化的现象⁽⁷⁾。根据LRH属小分子半抗原,在体内逗留时间短,测不到抗体水平是可以理解的。而在免疫中出现性腺退化现象,则可能是剂量太高对性腺的抑制作用所造成的。

进一步将LRH类似物在福氏佐剂中乳化后对鲮鱼进行免疫,结果在注射后的第13天即达到测得出的抗体水平,19天开始有的个体出现性腺退化的现象,32天后其抗体滴度为320并普遍存在性腺退化现象,如果我们同样以完全佐剂只一次免疫30微克/尾,经50天后,虽然测得有很低水平的抗体存在,性腺不仅无退化现象,且发育良好,这说明前者性腺退化可能是由于剂量太大而造成的,后者的剂量范围对性腺的发育是有促进作用的。据报导⁽²⁰⁾大剂量LRH类似物促使垂体分泌促黄体生成素(LH),而LH的大量存在可以出现负反馈抑制,小剂量的LRH类似物常可促使垂体分泌卵泡刺激素(FSH)和LH两种促性腺激素。上述性腺发育方面的差异可能与此有关。另一个问题是LRH类似物在鲮鱼体内是否与血浆蛋白结合的问题。据研究⁽¹³⁾LRH在人血浆中消失较快,如由静脉注射100—200微克LRH,用生物鉴定方法在血浆内20分钟就测不到其存在,用放射免疫测定,注射后60分钟血浆里还有0.8—4毫微克/毫升的LRH存在。在体外进行实验,将LRH与血浆混合孵育90分钟,没有发现其活性有任何损失,将这种孵育混合液经葡聚糖G-200凝胶

过滤证明LRH没有与主要血浆蛋白结合。而我们放射免疫测定中发现¹²⁵I-LRH类似物与鲮鱼抗血清及家兔正常血清结合后经圆盘电泳分离后在白蛋白区有个结合峰。看来LRH类似物与血浆蛋白是否存在非特异性结合有待进一步的研究。

2、关于鲮鱼的免疫球蛋白问题

按我们的免疫方法, 鲮鱼经LRH类似物于完全佐剂中免疫后, 抗体滴度高达320, 经聚丙烯酰胺圆盘电泳与被动血凝实验证明有 γ -位特异性抗体存在。其他 α 区、A区为可疑阳性反应, 同时用放射免疫圆盘电泳法也出现在 γ 区有结合峰, 此外 α 区、A区也可能存在有免疫球蛋白及免疫蛋白组分。据用Migram's⁽¹⁷⁾方法观察发现在鲤鱼(Cyprinus)与鳊鱼(Perca)沉淀组分甚至可伸到白蛋白区。这与我们4.1.实验中出现在 α 区与A区可疑反应有类似之处。

在肺鱼⁽¹⁴⁾能够分离到二种免疫球蛋白样物质, 其中一个很象IgM(19S)另一个为(5.9S), 它与目前已知的高等动物的免疫球蛋白都不相同, 为肺鱼所特有的, 在真骨鱼这种情况, 还没搞清楚。这些都说明鱼类的免疫球蛋白存在很大的不同, 除了一般认为有 γ -位的免疫球蛋白外, 还可能有各种鱼类本身所特有的免疫球蛋白, 在鲮鱼除了有 γ -位的免疫球蛋白外, 还可能有 α -位免疫球蛋白与白蛋白区的免疫蛋白组分。

另一方面, 我们在鲮鱼免疫过程中还发现, 随着免疫时间的不同, γ -位的组分增高, 而白蛋白下降。这与在人类治疗炎症疾病过程中血浆蛋白明显升高, 特别 γ_2 球蛋白(注: γ_2 为具有抗体活性的IgG)升高显著, 而白蛋白则减少⁽¹⁸⁾。草鱼肠炎的人工免疫及天然感染肠炎后, 血清用醋酸纤维膜电泳分析, 结果都出现 γ -位球蛋白的增高与白蛋白的下降⁽¹⁹⁾。根据鲮鱼有免疫球蛋白的存在, 这对鲮鱼疾病的免疫治疗提出了可能性。

小 结

1、本实验采用了被动血凝法、聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳及放射免疫分析, 研究了鲮鱼对LRH类似物的免疫反应。

2、在鲮鱼用LRH类似物完全福氏佐剂免疫32天后, 其抗体滴度可达320。

圆盘电泳与被动血凝复合分析以及放射免疫定性分析, 结果表明鲮鱼抗LRH类似物抗体可能与 γ -位免疫球蛋白有关, 这表现在 γ -位有强阳性被动血凝反应和标记¹²⁵I-LRH特异性结合表现有较高的峰值。另外, 随着免疫过程的进展而出现 γ -球蛋白的含量增高, 而白蛋白含量的下降。

3、本报告结合新激素LRH类似物抗原性问题的讨论, 这对新激素的合理使用提供参考资料并根据鲮鱼免疫反应中产生 γ -球蛋白的现象, 说明了鲮鱼的免疫反应的性质和鱼病免疫治疗的可能性。

参 考 文 献

- [1] 放射免疫分析及其他放射体外测定方法, 原子能出版社, 1975, 14—17.
- [2] Corbel, M. J., *Immune-response in fish (Review)*, *J. fish Biol.*, 1975, 539-563.
- [3] Bracklehurst, W. E., *In Handbook of Experimental Immunology*, Vol.3, *Application of Immunological methods A 2.2-A2.5*.
- [4] 中国医学科学院三室蛋白质组、武医附二院, 针刺麻醉前后病人血清蛋白质电泳图谱变化的初步观察, 武汉医学院学报, 1976年增刊, 85.
- [5] Rose, N. R., et al., *Methods in Immunodiagnosis*. 1973, 51-54.
- [6] Rippel, R. H., et al., *Inhibition of HCG-induced Ovarian and uterine weight augmentation in immature rat by analogs of GnRH.*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 152 (1976), 432-436.
- [7] 張素雅等, 人类绒毛膜促性腺激素(HCG)、鲢鱼垂体及下丘脑促黄体释放激素(LRH)类似物对家鱼免疫反应的初步研究, 淡水渔业, 6(1977), 10—19.
- [8] Weight, P. H., et al., *Plasma Volumes and Em'ragment of Plasma in tissues of Normal and insulin immunized guinea pigs*, *Proc. Soc. Exp. Biol. med.*, 153 (1976), 92-97.
- [9] 王兴娟等, 聚丙烯酰胺凝胶电泳的初步经验, 生物化学与生物物理进展, 4 (1974), 56.
- [10] Engle, R. L., et al., *Plasma cells and Serum Protein in marine fish.*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 98(1958), 905.
- [11] Liefmaun, H., *Ueber die Hamalysine der Kaltblütler seren.*, *Berl. Klin. Wsch.* 1 (1911), 48, 1682.
- [12] Liethicum, D. S., et al., *Immunological responses of Pacific haffish. III. Serum antibodies to cellular antigens.*, *J. Immun.*, 105 (1970) 912.
- [13] Virkkunen, P., et al., *Plasma disappearance of injected synthetic LRH in man as measured by bioassay and radio-immunoassay.*, *J. clin. End. Metab.*, 39 (1974) 630.
- [14] Dorson, M., *Some characteristics of antibodies in the primary response of Rainbow trout, Salmo gairdneri.* *In Diseases of Fish (Ed. Mawdesley-Thomcs, L. E.)*, 1972, 129-140.
- [15] Greenwood, F. C., et al., *The Preparation of ¹²⁵I Labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity.*, *Biochem. J.*, 89 (1963), 114.
- [16] Heinzl, w., et al., *A New method for the Quantitative determination of antibody and antigen protein a sensitivity to five micrograms.*, *J. Lab. clin. Med.*, 66 (1965), 334.
- [17] Ambrosus, *Comparative investigation of Immune globulins of various vertebrate Classes.* *Nature Lond.*, 209 (1966), 524.
- [18] 中医研究院学术论文集, 人民出版社, 1959, 218.
- [19] 浙江省淡水水产研究所鱼病组, 正常草鱼、细菌性肠炎并发烂鳃病草鱼及免疫草鱼的血清学分析, 浙江淡水渔业, 4(1976), 11.
- [20] Seyler, J. L. E., and Reichlin, S., *Feedback Regulation of circulating LRF concentration in man.*, *J. clin. Endo. metab.*, 39 (1974), 906.