

# GnRH 在性成熟高白鲑神经系统及性腺中的分布定位

曹玉洁 贾斌 柳建新 李志远 张莉\*

石河子大学动物科技学院 新疆 石河子 832003

**摘要:**应用免疫组织化学方法,系统观察性成熟期高白鲑 (*Coregonus peled*) 神经系统及性腺中的促性腺激素释放激素(GnRH)的分布情况。结果表明,GnRH 在大脑、小脑、中脑、脊髓、延髓中免疫阳性反应明显,且主要分布在神经元内。GnRH 免疫阳性细胞在卵巢和精巢中均有分布,而且其阳性部位在卵巢主要分布于小生长期卵母细胞;在精巢中主要分布于间质细胞和精原细胞中。本文讨论了 GnRH 直接或间接参与高白鲑性腺发育成熟调节的可能性。

**关键词:**高白鲑; 促性腺激素释放激素; 神经系统; 精巢; 卵巢

中图分类号:Q954 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2011)05-114-06

## An Immunocytochemical Localization of GnRH in the Nerve System and Gonad of Mature *Coregonus peled*

CAO Yu-Jie JIA Bin LIU Jian-Xin LI Zhi-Yuan ZHANG Li\*

College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China

**Abstract:** Immunocytochemical staining technique was used to study the expression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the nervous system and gonad of *Coregonus peled*. The results showed that there were GnRH immunoreactive endocrine cells in the cerebrum, cerebellum, diencephalon, medulla oblongata, and spinal cord. There were GnRH immunoreactive endocrine cells in the ovary and testis. The positive staining was observed mainly in the small growing oocyte, and in the interstitial cells and spermatogonia. The possible physiological function and morphological evidence of GnRH regulation on the development of gonad in *C. peled* were discussed.

**Key words:** *Coregonus peled*; Gonadotropin-releasing hormone (GnRH); Nervous system; Spermery; Ovary

高白鲑 (*Coregonus peled*) 属鲑科白鲑属,为冷水性鱼类,自然分布于俄罗斯西伯利亚北纬 50° 以上的河流湖泊中,是俄罗斯重要的大水面积养殖品种。由于高白鲑适应性强、生长速度快、经济价值较高,又是典型的摄食浮游动物的鱼类<sup>[1]</sup>。自 1998 年以来,新疆连续 6 年引进高白鲑发眼卵经孵化后投放赛里木湖。并于 2000 年 6 月,在温泉县兴建了占地面积 6.666 7 hm<sup>2</sup> 的冷水鱼繁育基地,这是目前全国惟一的高白鲑繁殖基地<sup>[2-3]</sup>。

目前,关于高白鲑生殖系统发育的组织学研究很少,仅见少量关于繁殖生物学特性的跟踪观测和人工繁殖的报道。吐尔逊等<sup>[4]</sup>对高白鲑生殖器官外形发育的周年变化、繁殖力与体长及体重的关系进行了详细的研究。张人铭

\* 通讯作者, E-mail: zhangli5156@163.com;

第一作者介绍 曹玉洁,女,硕士研究生;研究方向:动物生殖生物学; E-mail: 1457839598@qq.com。

收稿日期:2011-05-03,修回日期:2011-07-04

等<sup>[5]</sup>在赛里木湖天然水域中直接捕捞高白鲑并进行采卵和授精技术研究。赛里木湖作为海拔 2 100 m 的高山冷水湖泊,生态环境绿色无污染,每年全湖冰封且湖水水温降至 3℃ 以下时,才能找到性成熟较好的雌雄个体。高白鲑生殖器官成熟转化非常快,群体繁殖期也非常短,这就造成采卵时间不易把握,人工繁殖时难以同时得到功能性雄性和雌性亲鱼,给种苗生产造成很大困难<sup>[6]</sup>。而如何促进性腺发育成熟就成了生产上亟待解决的问题。对鱼类的研究中发现,其体内存在促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH), 它的类似物即促性腺激素释放激素类似物(gonadotrophin-releasing hormone analogue, GnRH-A)可促进性腺发育成熟,以及排卵和排精<sup>[7]</sup>。而且 GnRH 在鱼类养殖中也具有潜在的应用价值,所以鱼类 GnRH 及促性腺激素释放激素受体(gonadotropin-releasing hormone receptor, GnRH-R)的结构与生物学功能研究成为神经内分泌和生殖生物学的热点之一<sup>[8]</sup>。

对 GnRH 在高白鲑神经系统、精巢和卵巢中的免疫细胞化学定位研究,迄今未见报道。有关对鱼类 GnRH 及其受体进行同步研究的报道主要集中在文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*)<sup>[9]</sup>、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)、鲇鱼(*Silurus asotus*)<sup>[10]</sup>上,对鲑科鱼类的研究极少。我们采用免疫细胞化学方法,用 GnRH 抗体对高白鲑神经系统、精巢和卵巢中的 GnRH 进行定位,探讨其在精巢和卵巢生理活动中可能的作用机制,为进一步探索其作为催产素能否诱导鱼体排精卵,也为 GnRH 参与调节精巢和卵巢发育的作用机制提供形态学资料。

## 1 材料与方 法

**1.1 取材制片** 性腺成熟后的雌性和雄性高白鲑各 10 尾,采于新疆赛里木湖。鲜活时解剖,依次取出脑、脊髓、精巢、卵巢,再将脑分为大脑、中脑、小脑、延髓。即刻投入 Bouin 液中,固定 12 h 后修块整理,再投入 Bouin 液中固定

12 h,共固定 24 h,梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片 6  $\mu\text{m}$ , APES 粘片剂贴片,40℃ 烘片 24 h,入 4℃ 冰箱中备用。

**1.2 试剂** APES 粘片剂,兔抗 GnRH 血清, SABC 试剂盒,均购自北京中杉生物技术有限公司。

**1.3 免疫细胞化学方法** 本研究使用的 SABC 法具体步骤如下:①以上切片经二甲苯脱蜡,梯度酒精下行入水后,于 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  的水溶液中室温处理 5 min,以消除内源性过氧化物酶活性;②正常血清(与二抗同种动物血清)在 37℃ 下孵育 20 min,以封闭非特异性第二抗体的结合;③滴加 GnRH 的抗血清(1:100),在 4℃ 下孵育过夜;④加生物素化二抗,在 37℃ 孵育 20 min;⑤加 SABC 复合物,37℃ 孵育 20 min;⑥用 DAB 显色液显色。以上所有过程均在湿盒中进行,并保持 pH 为 7.3。阴性对照用正常血清取代一抗进行孵育,其他各步骤均与上述步骤同步进行。免疫染色完成后,脱水、透明、封片,于 Olympus 光学显微镜下观察,显微摄影。

## 2 结 果

**2.1 神经系统中 GnRH 免疫反应阳性细胞的分布** 观察显示,在性成熟期高白鲑的大脑、中脑、小脑、延髓等部位均有 GnRH 免疫反应阳性神经元和神经纤维存在。大脑神经元的形态多样化,胞体呈梭形、三角形、圆形等多种形态,突起有一个或多个,GnRH 的阳性反应主要分布于神经元的胞质中(图版 I:1),呈棕褐色,细胞核颜色浅淡,呈阴性。小脑中 GnRH 免疫阳性神经元胞体较大,细胞突起不明显(图版 I:2)。中脑的免疫阳性神经元分布密集,阳性细胞以中小型为主,胞体呈梭形或卵圆形,突起明显,染色较强(图版 I:3)。延髓中神经元无固定的形态,有圆形、椭圆形、不规则形等多种形态,GnRH 的免疫阳性神经元主要分布在胞浆中,为棕褐色,细胞核不着色呈空泡状(图版 I:4)。脊髓中免疫阳性分布与延髓比较相似,脊髓中一些神经元胞体和神经纤维均有 GnRH 免疫阳

性反应存在,免疫阳性神经元数量较少,胞体较大,呈多边形(图版 I:5),阳性神经纤维染色均为褐色或深褐色,呈串状或梭状。

## 2.2 性腺中 GnRH 免疫反应阳性细胞的分布

性成熟期高白鲑的精巢膨大,体积达到最大,储精囊充满精液,挤压鱼腹,呈细流状流出精液。光镜下观察精巢的横切面可将其分为外膜和实质两部分。外膜是一层结缔组织膜。实质部分由许多精小叶、小叶间质和输出管构成。精小叶呈管状,形状及分布不规则,在精小叶内壁分布有许多形状不规则的囊状结构,即精小囊。精小囊是支持细胞围成的结构。除精原细胞外,各期生精细胞均位于精小囊中,精囊腔内仍有大量的精子细胞和精子。GnRH 的阳性反应部位主要体现在精小叶周围的精原细胞和小叶间质的间质细胞中,为强阳性,染色为棕褐色(图版 I:6)。

性成熟期高白鲑的卵巢卵粒达到最大,卵粒游离,卵巢膜基本完全裂开,轻压鱼腹,卵粒即流出体外。观察此时的卵巢,一部分处于小生长期的初级卵母细胞,可见胞质有明显的卵黄核,呈椭圆形,染色较胞质稍浅,细胞外围有一层滤泡细胞。进入大生长期的初级卵母细胞中出现一层液泡,液泡之间存在少量卵黄颗粒。随着卵母细胞的生长和发育,滤泡细胞逐渐变为双层,放射膜增厚,卵黄颗粒数量不断增加。胞核所占比例缩小,核仁数目增多,大部分核仁仍分布在核膜边缘。还可观察到初级卵母细胞经过成熟分裂向次级卵母细胞过渡的卵母细胞,细胞质中充满粗大的卵黄颗粒,在成熟的过程中逐渐融合成板块状,核膜已经消失。GnRH 的阳性反应部位主要分布在 I ~ II 期的小生长期卵母细胞中,胞质、胞膜与核膜呈阳性(图版 I:7)。大生长早期卵母细胞呈阴性反应,胞核不着色,呈空泡状,整个细胞质和细胞核都无棕色颗粒物质。成熟卵母细胞整个细胞核和细胞质都呈阴性反应(图版 I:8)。

## 3 讨 论

促性腺激素释放激素(GnRH)首先从哺乳

动物的下丘脑被分离出来,它控制垂体促黄体激素(LH)和卵泡刺激素(FSH)的释放,在生殖过程中起着重要的作用<sup>[11]</sup>。现已发现,从低等脊椎动物(如七鳃鳗 *Lampetra japonica*)到高等哺乳动物的脑内都存在 GnRH 样肽,该物质在漫长的动物进化中结构和功能均具有相当的保守性<sup>[12]</sup>。近十多年来,国内外应用免疫细胞化学技术研究 GnRH 免疫反应神经元在鱼类及文昌鱼(头索类)各脑区的分布已有许多报道。方永强等<sup>[9]</sup>研究 GnRH 在文昌鱼脑及哈氏窝的分布,结果显示,其主要分布在文昌鱼端脑前端和靠近中脑的背部、中脑中部、神经管及哈氏窝中。免疫阳性胞体有多种类型,一种是大型胞体,在端脑和中脑可见;另一种为中等和小型胞体,这些胞体聚集在中脑中部(相当于鱼类下丘脑)以及端脑。方之平等<sup>[10]</sup>研究鲑鱼和黄颡鱼脑、垂体中 GnRH 的分布,免疫反应阳性神经元和神经纤维在两种鱼的下丘脑、第三脑室周围、端脑、中脑、延脑、小脑颗粒层等部位均有分布,而且大部分存在于下丘脑视前核和结节外侧核。性成熟前后端脑、中脑、延脑和小脑 GnRH 阳性反应物质变化不大,而性成熟后下丘脑中阳性神经元和神经纤维则明显多于性成熟前。本研究发现,在高白鲑大脑、中脑、小脑、延髓和脊髓中均存在 GnRH,免疫阳性胞体在大脑和中脑中以小型胞体存在,小脑和延髓中可见中等胞体,而脊髓中以大型胞体存在。GnRH 在神经系统中分布特点和密度上与性腺的成熟有无关系,还需要进一步比较性成熟前后其分布密度的差异。下丘脑之外的其他脑区中的 GnRH 只在中枢神经系统中起神经传递和神经调节的作用<sup>[13]</sup>,还是不同脑区中的 GnRH 可作为一个整合单位而起调节作用<sup>[14]</sup>,这两种不同的说法还需要进一步商榷。

在脊椎动物或头索类 GnRH 首先与脑垂体及哈氏窝相关靶细胞受体结合,刺激其释放促性腺激素,激发性腺发育成熟和产卵,或是 GnRH 直接与卵巢 GnRH 受体结合,刺激卵巢类固醇激素的产生,导致卵巢成熟和排卵。方之平等<sup>[10]</sup>研究鲑鱼、黄颡鱼卵巢中 GnRH 的分

布,性成熟前卵细胞胞质阳性反应染色较淡,性成熟后卵细胞 GnRH 免疫阳性反应强度明显增加,阳性反应物质分布在卵巢中第Ⅱ时相初级卵母细胞的胞质中,胞核呈阴性反应;而在成熟的第Ⅳ时相卵细胞中未见到 GnRH 阳性反应物质。方永强等<sup>[15]</sup>发现 GnRH 免疫活性物质定位在不同发育时期长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 卵母细胞胞质、核膜和生殖被膜中。而我们的实验中,性成熟高白鲑卵巢中的大生长期卵母细胞中未见到 GnRH 阳性反应,但处于小生长期的卵母细胞中存在 GnRH 阳性反应。故认为 GnRH 参与调节高白鲑卵母细胞发育成熟的作用机制,除受到 HPG 轴神经内分泌调控外,还受到性腺局部组织细胞之间的相互调节,通过与卵母细胞膜上的 GnRH 受体相结合,而后刺激其生成性类固醇激素,促进高白鲑卵母细胞的发育。翁幼竹等<sup>[16]</sup>发现文昌鱼精巢Ⅱ~Ⅲ期,GnRH 受体 mRNA 强的杂交信号定位在精原细胞、精母细胞和可能的足细胞中;方永强等<sup>[17]</sup>研究文昌鱼成熟精巢,GnRH 受体免疫阳性物定位在精原细胞、精母细胞和精细胞上。而我们的研究显示,在成熟精巢中 GnRH 分布在精原细胞和支持细胞中,说明其也参与调节精巢中生精细胞的发育。这为“下丘脑-垂体轴系”之外的组织存在 GnRH 以及 GnRH 能以旁分泌/自分泌的机制局部调节多肽激素分泌及类固醇激素的产生提供了新的研究资料。

鱼类体内的性激素水平对性腺发育成熟起着直接的调节作用。不同外源激素在促性腺激素释放素、促性腺激素和性类固醇激素 3 个不同水平对鱼类的性腺发生作用。诱导鱼类性腺成熟的激素处理方法已成为诱导鱼类成熟产卵成功与否的关键之一<sup>[18]</sup>。大西洋鲑鱼 (*Salmo salar*) 注射促性腺激素释放激素激动剂 (gonadotropin releasing hormone agonist, GnRH-a),促使不同步发育的卵母细胞成熟,诱导排卵<sup>[19]</sup>。本实验采用免疫组织化学的方法研究了 GnRH 在高白鲑神经系统和性腺中的分布,探讨鱼体在精巢和卵巢生理活动中可能的作用机制,后续的实验是进一步埋植催产激素

GnRH-A,观察鱼体性腺发育成熟情况,为解决高白鲑大批量苗种人工繁育问题提供理论依据,为此鱼的进一步市场开发奠定基础。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Bernatchez L, Chouinard A, Lu G Q. Integrating molecular genetics and ecology in studies of adaptive radiation: whitefish, *Coregonus* sp., as a case study. *Biological Journal of the Linnean Society*, 1999, 68(1/2): 173 - 194.
- [ 2 ] 张人铭,蔡林钢,吐尔逊,等. 赛里木湖高白鲑性腺发育观测. *水产学杂志*, 2001, 14(1): 66 - 69.
- [ 3 ] 郭焱,张北平,张人铭,等. 赛里木湖高白鲑引种移植效应评价. *水利渔业*, 2003, 23(3): 30 - 32.
- [ 4 ] 吐尔逊,蔡林钢,郭焱,等. 赛里木湖高白鲑繁殖生物学特性研究. *水产学杂志*, 2004, 17(2): 26 - 31.
- [ 5 ] 张人铭,蔡林钢,吐尔逊,等. 赛里木湖高白鲑的人工繁殖. *淡水渔业*, 2001, 31(5): 12 - 13.
- [ 6 ] 张人铭,蔡林钢,吐尔逊,等. 赛里木湖高白鲑性腺发育观测. *水产学杂志*, 2001, 14(1): 66 - 69.
- [ 7 ] 方永强,齐襄,洪桂英. 促性腺激素释放激素类似物诱导文昌鱼产卵的初步研究. *台湾海峡*, 1989, 8(3): 278 - 280.
- [ 8 ] Zohar Y, Mylonas C C. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 2001, 197(1/4): 99 - 136.
- [ 9 ] 方永强,黄威权,陈蕾,等. GnRH 在文昌鱼脑和哈氏窝的分布. *动物学报*, 1999, 45(1): 106 - 111.
- [ 10 ] 方之平,潘黔生,罗立廷,等. GnRH 及其受体在性成熟前后鲑、黄颡鱼脑、垂体和卵巢中的免疫细胞化学定位. *水生生物学报*, 2004, 28(1): 63 - 68.
- [ 11 ] Matsuo H, Baba Y, Nair R M G, et al. Structure of the porcine LH-and FSH-releasing hormone. I: The proposed amino acid sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1971, 43(6): 1334 - 1339.
- [ 12 ] Sherwood N M. Evolution of a neuropeptide family: gonadotropin-releasing hormone. *Integrative and Comparative Biology*, 1986, 26(4): 1041 - 1054.
- [ 13 ] Sherwood N M, Lovejoy D A, Coe I R. Origin of mammalian gonadotrophin-releasing hormones. *Endocrine Research*, 1993, 14(2): 241 - 254.
- [ 14 ] Rosenblum P M, Goos H J T, Peter R E. Regional distribution and *in vitro* secretion of salmon and chicken-Ⅱ gonadotropin releasing hormones from the brain and pituitary of juvenile and adult goldfish, *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology*, 1994, 93(3):

- 369 - 379.
- [15] 方永强, 翁幼竹, 刘丽丽, 等. 5-HT 和 GnRH 及其受体在长牡蛎卵巢的生理作用机制——双染和免疫细胞化学定位. *动物学研究*, 2003, 24(6): 462 - 466.
- [16] 翁幼竹, 黄威权, 方永强, 等. 文昌鱼神经系统、哈氏窝和性腺 GnRH 受体 mRNA 原位杂交的研究. *动物学研究*, 2000, 21(6): 437 - 441.
- [17] 方永强, 黄威权, 陈蕾. GnRH 受体在文昌鱼神经系统、哈氏窝和性腺的免疫组织化学定位. *科学通报*, 1999, 44(4): 385 - 388.
- [18] Mylonas C C, Zohar Y. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2001, 10(4): 463 - 491.
- [19] Vikingstad E, Andersson E, Norberg B, et al. The combined effects of temperature and GnRHa treatment on the final stages of sexual maturation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) females. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2008, 34(3): 289 - 298.

## 图 版 说 明

1. 高白鲑大脑中 GnRH 免疫反应阳性细胞的分布, →示阳性神经元, ×400; 2. 高白鲑小脑中 GnRH 免疫反应阳性细胞的分布, →示阳性神经元, ×400; 3. 高白鲑中脑 GnRH 免疫反应阳性细胞的分布, →示阳性神经元, ×400; 4. 高白鲑延髓中 GnRH 免疫反应阳性细胞的分布, →示阳性神经元, ×400; 5. 高白鲑脊髓中 GnRH 免疫反应阳性细胞的分布, →示阳性神经元, ×400; 6. 高白鲑精巢中 GnRH 免疫反应阳性细胞的分布, →示阳性免疫细胞, ×400; 7. 高白鲑卵巢中 GnRH 免疫反应阳性细胞的分布, →示阳性免疫细胞, ×100; 8. 高白鲑卵巢中 GnRH 免疫反应阳性细胞的分布, 成熟卵母细胞呈阴性(→), ×100。

## Explanation of Plate

1. Immunohistochemical localization of GnRH in the cerebrum of the *Coregonus peled*. Small arrow indicates a positive nerve cell (the same applied in the following figure), ×400; 2. Localization of GnRH in the cerebellum, ×400; 3. Localization of GnRH in the diencephalon, ×400; 4. Localization of GnRH in the medulla oblongata, ×400; 5. Localization of GnRH in the spinal cord, ×400; 6. Localization of GnRH in the testis, ×400; 7. Localization of GnRH in the ovary, ×100; 8. Localization of GnRH in the ovary, →showing negative staining in mature oocytes, ×100.

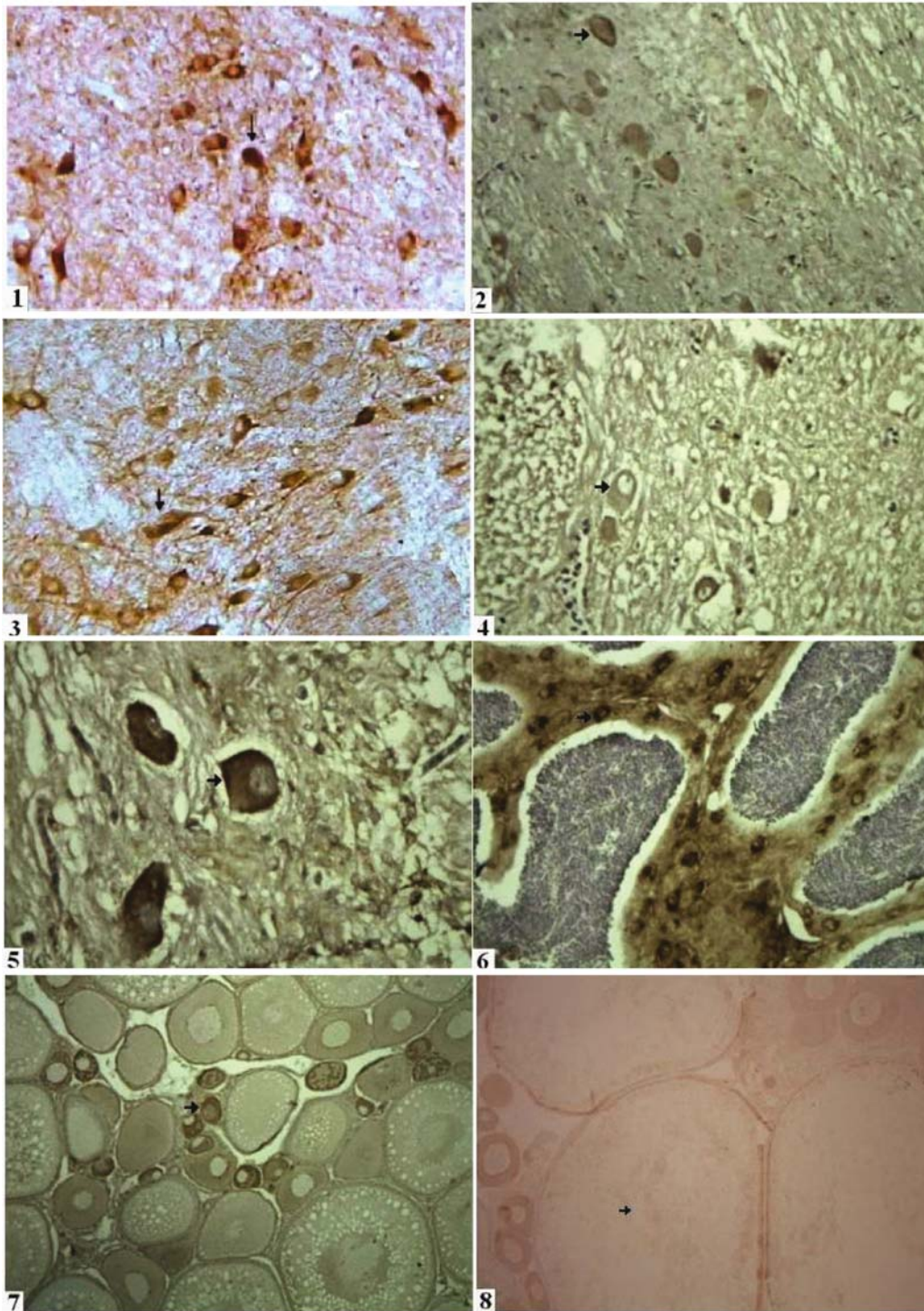


曹玉洁等:GnRH 在性成熟高白鲑神经系统及性腺中的分布定位

图版 I

CAO Yu-Jie *et al.* : An Immunocytochemical Localization of GnRH in the Nerve System  
and Gonad of Mature *Coregonus peled*

Plate I



图版说明见文后