

鱼类生殖内分泌学研究的进展及其在渔业生产中的应用

林浩然

(中山大学生物系)

鱼类生殖活动的整个调节过程包括:感觉器官把外界环境的刺激(如温度、光照、降雨等)传送到脑,使下丘脑产生促性腺激素释放激素(GnRH)和促性腺激素释放的抑制因素(GRIF),激发或抑制脑垂体合成和释放促性腺激素(GtH);促性腺激素作用于性腺并促使它分泌性类固醇激素,以诱导性腺发育成熟以及排出卵子和精子。在整个过程中,前阶段是神经联系起主要作用,后阶段则是激素起主要作用。由神经联系转变为激素调节是发生在下丘脑和脑垂体之间的接触面,实现这种转变是通过神经分泌细胞的神经分泌活动。

下面着重围绕下丘脑和脑垂体之间神经分泌活动的调节作用,介绍近年来的研究进展以及新型高效鱼类催产剂的概况。

一、下丘脑和脑垂体的基本构造

鱼类和其他脊椎动物一样,在下丘脑和脑垂体区,神经分泌细胞的细胞体位于下丘脑内,它的轴突纤维和末梢组成神经垂体,而轴突纤维的细微分支则广泛和腺垂体的分泌细胞相联系。这样,分泌产物在细胞体内合成和包装,经过轴突运输到末梢,然后接受脑(神经中枢)的信号刺激而释放在微血管附近,从而把神经信号和激素信号联系起来。

在哺乳类或其他较高等的脊椎动物,微血管在下丘脑的正中隆起集中而形成一系列门血管,把血液从下丘脑的神经分泌组织带到腺垂体的分泌组织,从而增强下丘脑和腺垂体之间的激素联系。但是,硬骨鱼类下丘脑没有明显的正中隆起,脑垂体亦没有真正的门脉系统;而是神经分泌细胞的末梢直接伸入到腺垂体的分

泌细胞或形成直接的突触联系^[37]。例如,鱼类下丘脑视前核神经原产生的激素,主要释放到位于神经垂体和腺垂体之间的血液通道;有些鱼类视前核发出的神经纤维能直接分布到腺垂体分泌细胞。同样,下丘脑外侧结节核的神经分泌细胞能直接发出神经纤维分布到腺垂体间叶的分泌细胞,并在连接处释放激素,促进该类细胞的分泌活动。最近对鱼类腺垂体 GtH 细胞神经支配的研究表明,下丘脑神经分泌细胞的轴突能直接到达 GtH 细胞并建立突触联系,这些神经分泌纤维因其含有分泌物质的染色性质和颗粒的直径不同而分为两类: A 型纤维为 Gomori 阳性,为铬-明矾苏木精、阿利新兰、酸性复红、醛硫堇等染色,颗粒直径为 100—200 毫微米; B 型纤维为 Gomori 阳性,小囊泡直径为 60—100 毫微米。许多学者认为 GtH 细胞受到这两种神经分泌纤维的双重支配,反映出它们对 GtH 的合成与释放有不同的调节作用,因而 A 型纤维可能是来自视前核的肽能轴突, B 型纤维则为外侧结节核的胺能轴突^[43]。但需要进一步证实。

根据 Ball (1969) 的定义: GtH 细胞是“在性成熟之前还没有或者处于静止状态的、其分泌活动和生殖周期相互联系而表现明显变化的、位于中腺垂体腹部的嗜碱性细胞”。近年通过组织生理学、免疫细胞化学和超显微结构的研究,进一步确定鱼类普遍存在一种具有明显特征而又较易鉴别的 GtH 细胞类型,它们常集中在中腺垂体腹区,在性腺成熟期间,数量增多,体积增大,含有直径为 200—300 毫微米的过碘酸-雪夫反应和阿利新兰阳性分泌颗粒和形状较大、电子密度较小的球形分泌颗粒;颗粒

内质网池为圆形或不规则形^[43]。至于是否还有第二种 GtH 细胞类型,尚需通过组织生理学和使用硬骨鱼类两种不同 GtH 抗血清的免疫细胞化学的综合研究才能最后确定。

二、鱼类的促性腺激素 (GtH)

相当纯的 GtH 已经从一些硬骨鱼类的脑垂体提取出来,包括鲤鱼、虹鳟、大麻哈鱼、罗非鱼、海鳗等,表明它具有高等脊椎动物 GtH 的一般化学结构特点,是一种糖蛋白。

到 1975 年,化学分离提纯和生物测定的研究结果支持硬骨鱼类脑垂体只产生一种 GtH 的观点,认为这种 GtH 能调节生殖周期的所有时期,包括卵黄生成,卵母细胞成熟,排卵,精子发生,精子排出,类固醇性激素产生等。随后,对鱼类 GtH 的化学结构亦深入研究并和哺乳类的 LH 和 FSH 做比较。例如, Yoneda 等^[44]分析大麻哈鱼的 GtH 分子量为 37,000,其中糖含量(己糖、氨基糖和唾液酸)占 10.7%,分子量约为 4,000;多肽占 89.3%,分子量约为 33,000。如果和哺乳类的 LH 或 FSH 相比,大麻哈鱼 GtH 和羊-FSH (分子量 32,000)的组氨酸、精氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸等氨基酸组成相似;而和牛-LH (分子量 29,300)的丙氨酸、半胱氨酸和蛋氨酸等氨基酸组成相似;此外,大麻哈鱼 GtH 的脯氨酸和亮氨酸的组成介于 FSH 和 LH 之间,苏氨酸、缬氨酸和异亮氨酸比 FSH 与 LH 的多,而赖氨酸和苯丙氨酸比 FSH 与 LH 的少。所以,从氨基酸组成看,大麻哈鱼 GtH 和羊-FSH 的相似程度大于牛-LH。Burzawa-Gerard^[6]指出鱼类 GtH 含有较多的脯氨酸(鲤鱼 19, 鲟鱼、大麻哈鱼、罗非鱼各为 18)而和 LH 有些相近,但谷氨酸和天冬氨酸却比 LH 多而和 FSH 相近。所以,如果考虑氨基酸组成,鱼类的 GtH 和 LH 与 FSH 都有相似之处。在碳水化合物的组成方面,鱼类 GtH 含有的己糖与氨基糖和 LH 的比较接近,而唾液酸的含量较少。鱼类的 GtH 和哺乳类的 LH 与 FSH 一样都由 α 亚单位和 β 亚单位组成,其 α 亚单

位含有 96 个氨基酸,组成十分相似,但鲤鱼 GtH 的 α 亚单位含有较多的天冬氨酸和缬氨酸,而认为起重要作用的脯氨酸和半胱氨酸则差别不大。 β 亚单位的差别比较明显,哺乳类 LH 的 β 单位含有 119 个氨基酸,而鲤鱼只含有 116 个氨基酸,且谷氨酸和天冬氨酸的含量要比 LH 的多。总之,鲤鱼 GtH 的 β 亚单位和哺乳类 LH 的较相近,而与 FSH 的差别较大。

由于组织学研究对鱼类有一种或二种 GtH 细胞没有取得一致的结果,因而促使对硬骨鱼类是否有多于一种 GtH 的深入研究。1975 年起,加拿大的 Idler 等对 GtH 分离提纯技术做了改进,使用能有选择性吸收糖蛋白的伴刀豆球蛋白-琼脂糖凝胶 (Concanavalin-A-Sepharose) 进行亲和层析,先后报道从拟庸鲈、大麻哈鱼和鲤鱼的脑垂体提取物中分离出两种类型的 GtH,一种用 Con-A-Sepharose 层析时不被吸附,因而不是糖蛋白或者糖含量很少,称为 ConA I 部分,另一种被 Con-A-Sepharose 吸附,然后用含有 α -甲基-D-葡萄糖苷的缓冲液洗脱出来,是含糖量很高的糖蛋白,称为 ConA II 部分。生物活性研究表明这两个 GtH 部分有明显差别。Con A I 的生物活性只限于刺激卵黄蛋白掺入到正在发育的卵母细胞内以及刺激类固醇生成;Con A II 的生物活性范围很广,包括:刺激性腺组织产生 CAMP 和类固醇生成、精子发生、精子释放、卵母细胞生长、成熟和排卵^[22,29]。在分离提纯过程中, Idler 等发现 Con A I 和 Con A II 都有高分子量 (45,000—62,000) 类型和低分子量 (25,000—28,000) 类型,但有不同等电点聚焦^[23]。在化学组成方面,ConA II 的己糖总含量变动于 6—15%,而 ConA I 只有 1—2%;ConA II 的氨基糖和唾液酸含量亦明显比 Con A I 高。根据对大麻哈鱼、拟庸鲈、鲤鱼 ConA I 和 ConA II 氨基酸组成的分析,虽然都富于天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸和亮氨酸,但 ConA I 含有较多的谷氨酸,Con A II 则含有较多的苏氨酸^[23]。此外,试验已证明 Con A I 和 Con A II 相互之间

没有明显的放射免疫测定交叉反应；将它们和大剂量的碳水化合物分解酶一起孵育并不影响其免疫反应能力，说明这两种 GtH 之间的免疫学差别是由于其蛋白质部分不同。根据 Con AI 和 Con A II 表现明显不同的层析、化学组成、免疫和生物学特征，Idler 等认为这是硬骨鱼类具有的两种促性腺激素，可以分别称为促卵黄生成激素 (ConA I) 和促性腺成熟激素 (Con A II)，以直接反映它们在硬骨鱼类的生理机能。虽然促性腺成熟激素能刺激卵母细胞成熟和性类固醇激素生成而可以和哺乳类的 LH 比拟，但促卵黄生成激素则不同于哺乳类的 FSH，因为哺乳类的 FSH 不能刺激卵黄蛋白原掺入硬骨鱼类的卵母细胞，而且，哺乳类的卵巢生长和成熟过程并没有卵黄生成阶段。所以，鱼类的两种促性腺激素与哺乳类的 FSH 和 LH 不同^[23]。

Burzawa-Gerard 等^[29]已阐明鲤鱼促性腺成熟激素的亚单位结构。用变性剂如尿素和丙酸能把鲤鱼促性腺成熟激素裂解为其亚单位，然后在二乙氨基葡聚糖凝胶柱上层析而分离。 α 亚单位不被吸收，分子量为 14,000； β 亚单位为这种离子交换剂吸收，分子量为 17,000。每个亚单位只保留整个激素生物活性的很小部份，将两个亚单位再结合能使原来生物活性的大部分得到恢复。 α 亚单位有两种类型，差别是在 NH₂ 一端有或没有九肽；较长的类型其 33 个氨基酸的 NH₂ 一端氨基酸的序列表明和哺乳类 FSH 和 LH 的 α 亚单位同源。 β 亚单位 NH₂ 一端头 26 个氨基酸的序列表明和哺乳类 LH 和 FSH 的 β 亚单位同源。用鲤鱼促性腺激素的 β 亚单位和哺乳类 LH 或 FSH 的 α 亚单位相结合能形成杂种分子，但鲤鱼的 α 亚单位不能和哺乳类的 β 亚单位相结合。和哺乳类一

样，鱼类的 α 亚单位含有抗原决定因素，而 β 亚单位起生物学特异性作用^[21]。许多研究都证明硬骨鱼类促性腺激素具有明显的免疫特异性，脑垂体和血浆中促性腺激素含量的放射免疫测定，通常只能在很相近的种类中进行。到目前为止，促性腺成熟激素的特异性放射免疫测定已经在鲤科、鲑科、鲈科和鲟鱼科建立；而鲤鱼 GtH 的 β -亚单位抗血清已证明可以用来对欧洲鳗鲡和大鳞副泥鳅的 GtH 进行放射免疫测定^[20,26]。但是，促卵黄生成激素的亚单位结构还未曾确定，它的特异性放射免疫测定方法亦还没有建立。鲑科和鲤科等促性腺成熟激素放射免疫测定技术的建立，就能够研究这些鱼类在整个生殖周期血浆和脑垂体的促性腺激素含量变化以及其调节作用机理。

三、鱼类的促性腺激素释放激素(GnRH)

早期的研究表明硬骨鱼类下丘脑粗提取物能促进 GtH 分泌。对下丘脑粗提物的放射免疫研究表明：硬骨鱼类(罗非鱼)、爬行鱼(龟)和鸟类(鸡)的 GnRH 有相似的免疫反应。用阳离子交换与亲和层析和高压液相色谱进一步表明鱼类、爬行类和鸟类的 GnRH 很相似，而两栖类和哺乳类的 GnRH 亦很相似^[24]。对一些硬骨鱼类下丘脑提取物的层析和免疫反应研究证明它们的 GnRH 和哺乳类的 LHRH 虽有相类似之化学结构，但尚有区别，可能是在十肽的第七和(或)第八位氨基酸上有不同^[32]。到 1983 年美国的 Sherwood 等^[38]用凝胶过滤和高功能液相色谱等技术从大麻哈鱼脑提取液分离出 s-GnRH，证实鱼类第七和第八位的氨基酸和哺乳类的 GnRH(亦即 LHRH)不同(见图 1)。

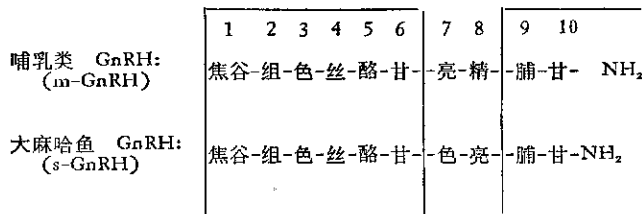


图 1 哺乳类和大麻哈鱼 GnRH (即 m-GnRH 和 s-GnRH) 的比较。

从比较 m-GnRH 和 S-GnRH 的化学结构表明: GnRH 的结构在长期进化过程中是相当稳定而保守的,因为整个分子的肽链长度, NH₂ 和 COOH 的末端以及 1—6 位和 9 与 10 位的氨基酸都保持不变。s-GnRH 和 m-GnRH 第八位的精氨酸不同,而在第七位增多一个色氨酸,因而表现较强的疏水性。s-GnRH 第八位的亮氨酸转移到 m-GnRH 的第七位上,这可能是由于两个独立的氨基酸取代过程,即:第七位的色氨酸为亮氨酸取代,第八位的亮氨酸为精氨酸取代。s-GnRH 和 m-GnRH 在进化过程中产生的化学结构的差别可能对和受体的结合能力十分重要,但对机能效应方面影响不大。因为 m-GnRH 的第二位组氨酸和第三位色氨酸是产生机能作用(促进 LH 和 FSH 释放)的关键氨基酸;在这两个位置为其他氨基酸取代的类似物虽能和脑垂体竞争性结合,却没有 GnRH 的活性。而其他位置的氨基酸(即第一位和第四到第十位)只参与构象作用(空间结构)和受体结合以及抵抗酶的分解作用等。所以, m-GnRH 第七位亮氨酸和第八位精氨酸为其他相近氨基酸取代时通常都会使生物活性降低。事实亦是这样, s-GnRH 对哺乳类的活性比 m-GnRH 低。用合成的 s-GnRH 刺激鼠脑垂体分泌 LH,其活性只有 m-GnRH 的 2—3%。但是, s-GnRH 对大麻哈鱼却显示相当

强的活性。对银大麻哈鱼每公斤体重注射 20 微克人工合成的 s-GnRH,能诱导 12 尾中的 9 尾排卵;用 s-GnRH,类似物注射的效果还更好。

Sherwood 等^[39]对一些有经济价值的鱼类如鲷鱼、遮目鱼、虹鳟等,取脑粗提取物(经丙酮/HCl 和石油醚抽提)再经过高压液相色谱分离提纯的 GnRH,然后进行免疫交叉反应,证明这些鱼类脑里含有的多肽在层析和免疫特点方面都和合成的 s-GnRH 一样。而在这几种鱼的脑里却检测不到类似 m-GnRH 的物质,这表明鲑鱼型的 GnRH 可能广泛分布在硬骨鱼类中,因为这几种鱼代表三个不同的目(鲱形目、鲷形目和鲑形目)。

法国的 Breton^[7]对鳟鱼、金鱼和鲷鱼进行类似试验,亦证明它们的 GnRH 和 s-GnRH 一样。因此,目前认为 s-GnRH 可能就是硬骨鱼类的 GnRH。但还需做更多的试验才能证实。

Peter 等^[36]对金鱼用 m-GnRH, s-GnRH 和一种鸟类 GnRH (b-GnRH) 以及它们的类似物进行一系列对比试验,并且利用多巴胺拮抗物 pimozide 以增强它们促使金鱼脑垂体 GtH 分泌的效应,以分析 m-GnRH 和 s-GnRH 在金鱼的结构和活性的相互关系。其所试验的 GnRH 及类似物有以下几种:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
m-GnRH	焦	谷	—组—	色—	丝—	酪—	甘—	亮—	精—	脯—	甘—NH ₂
m-GnRH-A						-D-丙—				—NEt	
m-GnRH-B						-(imB ₂ l)-D-组—				—NEt	
b-GnRH									—谷—		
b-GnRH-A						-D-色—			—谷—		
s-GnRH									—色—	亮—	
s-GnRH-A						-(imB ₂ l)-D-组—		色—	亮—	—NEt	
s-GnRH-B									—色—		
s-GnRH-C									—色—	亮—	—甘—OH
s-GnRH-D									—谷—	亮—	
s-GnRH-E						-D-丙—			色—	亮—	—NEt
s-GnRH-F						-D-精—			色—	亮—	—NEt

结果表明: 1. m-GnRH, b-GnRH 或 s-GnRH 分别单独注射对诱导金鱼 GtH 分泌的作用很小, 甚至没有作用; 注射 pimozide 3 小时后再注射 m-GnRH, b-GnRH 或 s-GnRH, 诱导金鱼 GtH 释放明显增加, 而增加的幅度和持续时间都很相似。这提示金鱼脑垂体的 GnRH 受体通常不能辨别 GnRH 在第七位和第八位之间的氨基酸替换。2. 将色氨酸移到第八位的 s-GnRH- β , 即和 s-GnRH 的第七和第八位的氨基酸序列相反, 对诱导金鱼脑垂体 GtH 分泌的活性很小, 这说明 s-GnRH 的真正原始结构就是 [色⁷-亮⁸]-GnRH。3. 第七位为谷氨酸的 s-GnRH-D, 亦即将谷氨酸由第八位移到第七位的 b-GnRH, 和 pimozide 的共同作用促进金鱼脑垂体 GtH 分泌的活性要比 m-GnRH 或 s-GnRH 和 pimozide 共同作用明显增强, 这提示 pimozide-s-GnRH-D 对金鱼是高活性的, 而 [谷⁷-亮⁸]-GnRH 亦可能就是金鱼的 GnRH 之一。由于金鱼脑抽提物的稀释液和 s-GnRH 放射免疫测定的标准相平行, 因而 [色⁷-亮⁸]-GnRH 亦有可能是金鱼的 GnRH。4. m-GnRH 的类似物在第六位换上芳香族的 D-氨基酸, 如 D-组氨酸 (imB₂1-D-His) 或 D-色氨酸, 并去掉第九位甘氨酸, 对哺乳类的活性要比 m-GnRH 提高近 100 倍; 而第六位换上 D-丙氨酸或 D-精氨酸并去掉第九位甘氨酸的 m-GnRH 类似物, 对哺乳类的活性亦比 m-GnRH 提高 10—30 倍。用 m-GnRH-B 或 b-GnRH-A 和 pimozide 一起对金鱼脑垂体 GtH 分泌的活性亦为 m-GnRH 或 s-GnRH 的几倍, 虽不及在哺乳类提高几十到 100 倍, 但对金鱼来说亦是高活性的类似物。然而, m-GnRH-A 和 pimozide 一起对金鱼的活性却和 m-GnRH-B 或 b-GnRH-A 一样, 这说明第六位换上芳香族 D-氨基酸在金鱼并不象在哺乳类那样明显的影响到 GnRH 类似物的活性。同样, s-GnRH-A (第六位换上芳香族的 D-氨基酸) 和 pimozide 一起对金鱼的活性亦和 pimozide 与 m-GnRH 或 pimozide 与 s-GnRH 是一样的。这些都说明金鱼脑垂

体 GnRH 受体的亲和性和(或) GnRH 多肽的代谢降解情况和哺乳类的有所不同。5. 在哺乳类, C-末端为甘¹⁰-OH 构型的 m-GnRH, 其活性要比 m-GnRH 小。而在金鱼, S-GnRH-C (C-末端为甘¹⁰-OH) 单独注射对促使 GtH 分泌没有作用, 但加上 pimozide, 却使金鱼脑垂体 GtH 分泌增加的幅度和 m-GnRH 或 s-GnRH 相似。这说明 s-GnRH-C, m-GnRH 和 s-GnRH 对金鱼的活性是一样的。可见 GnRH 的结构和活性的相互关系在哺乳类和在鱼类并不一样。6. m-GnRH 第六位换上 D-精氨酸的类似物对哺乳类的活性比 m-GnRH 大约提高 4 倍; 而 s-GnRH-F, 即第六位换上 D-精氨酸的 s-GnRH 类似物, 单独注射或者和 pimozide 一起促使金鱼脑垂体 GtH 分泌的活性却比其他各种 GnRH 及其类似物高。相反, s-GnRH-E, 即第六位换上 D-丙氨酸的 s-GnRH 类似物对金鱼的活性, 却并不象 m-GnRH-A (第六位换上 D-丙氨酸) 对哺乳类表示出高活性。这可能在 s-GnRH 的第六位换上一个酸性 D-氨基酸后影响了它在金鱼的代谢降解情况和对受体的结合亲和性。7. 在体外对金鱼脑垂体碎片的灌流试验表明 m-GnRH, s-GnRH 和 m-GnRH-A 的活性相等; 而对金鱼在体内注射试验表明 m-GnRH 和 s-GnRH 的活性相近, 而 m-GnRH-A 则显示相当高的活性, 这说明 m-GnRH-A 的高活性可能是由于它在金鱼体内的降解作用降低, 而不是由于和脑垂体的受体结合亲和性增强。相反, m-GnRH-A 对哺乳类的高活性既由于降解速率降低, 亦由于和受体结合的亲和性增强。这亦说明决定特异性的 GnRH 多肽对金鱼产生高活性的因素和哺乳类不完全相同。

总的看来, 鱼类 GnRH 的研究已经有了很大的进展, 一些硬骨鱼类的 GnRH 化学结构已经阐明, 并且正在发现和合成高活性的类似物, 但还需进一步研究以确定 GnRH 多肽在各种鱼类体内产生高活性的基础和根据, 以便人工合成鱼类本身的高活性 GnRH 类似物并应用于生产实际中。

四、鱼类促性腺激素释放的抑制因素 (GRIF)

Peter 等^[37]发现对性成熟雌金鱼进行电流损伤试验破坏下丘脑外侧结节核靠近脑垂体柄区时引起血清 GtH 含量急剧增高,并能持续至少 12 天;这些做过损伤手术的鱼尽管处于环境条件并不适宜于自然产卵的情况下(水温 12°C, 没有产卵附着物等),但绝大多数进行了排卵,而对照组或在端脑背部做损伤手术的鱼都没有排卵。这表明存在着一种 GtH 释放的抑制因素 (GRIF),而如果在脑垂体阻断 GRIF 的作用,就会导致 GtH 自动释放。Peter 等进一步的研究^[33]表明 GRIF 来自下丘脑视前隐窝区的前腹视前围脑室核 (NPP),并从这个中心经过侧视前区、前侧下丘脑区和脑垂体柄而到达脑垂体。采用 m-GnRH 或 s-GnRH 的抗血清对金鱼脑的免疫组织化学研究表明:GnRH 核周体主要集中在靠近视前围脑室核和视前核的外侧以及前围脑室核前部的外侧视前区。所以,在金鱼下丘脑,GnRH 核周体的分布和 GRIF 中心部位虽然靠近但并不重叠,说明它们有各自不同的细胞来源。

Peter 等^[35]将个体大小,性别,性腺发育状况相同的金鱼移植腺垂体到脑的不同部位后观察其对血清 GtH 含量的影响,进一步证明 GRIF 的存在。这些移植的腺垂体,不管是移植到脑旁边或者移入第三脑室靠近视前区,都能自动释放 GtH,表现为接受移植体金鱼的血清 GtH 含量增加,这说明在正常情况下原位腺垂体 GtH 的分泌活动是受到某种紧张性抑制的。再者,移植在脑旁边的腺垂体比移植到脑室内的腺垂体能释放较多的 GtH,这亦表明脑室内可能存在着 GRIF。

对不同季节和不同性腺发育状况的雌雄性金鱼进行下丘脑电流损伤试验和腺垂体移植试验表明^[31]:在所有性腺发育时期,雌雄性金鱼的 GtH 分泌活动都受到紧张性抑制,而 GRIF 的存在似乎是经常的持续不断的,只是在性腺退化时期的雌鱼作用比较小。这表现为雌金鱼

GtH 分泌能力有明显差别:处于性腺退化时期,GtH 自动分泌的能力较小;而在性腺成熟并处于排卵前期,GtH 的分泌能力最强。

此外,金鱼脑垂体的超显微结构研究亦表明:损伤下丘脑特定部位以清除 GRIF 的来源之后,脑垂体的 GtH 细胞处于分泌和合成活动都很活跃的状态^[28]。

Crim^[15]的初步研究提到有些儿茶酚胺能抑制孵育的虹鳟脑垂体释放 GtH。Chang 等^[11]系统研究各种影响儿茶酚胺神经递质合成或胺能神经原活动性的药物对金鱼血清 GtH 含量的影响。6-羟多巴胺是儿茶酚胺能的神经毒素,能引起血清 GtH 含量增高,表明儿茶酚胺参与抑制 GtH 的释放。用 α -甲基-对-酪氨酸 (α -MPT) 抑制多巴胺的前身物——二羟苯丙氨酸 (L-多巴)的合成以及用卡必多巴 (CBD) 抑制 L-多巴转变为多巴胺,都能引起血清 GtH 含量增高。但是,用二乙基二硫氨基甲酸 (DDC) 抑制多巴胺转变为去甲肾上腺素,对血清 GtH 含量没有影响。这些研究结果说明多巴胺对 GtH 分泌可能起抑制作用。

Peter 等^[9,10]的试验进一步支持多巴胺对 GtH 分泌活动起抑制作用。因为腹腔注射多巴胺及其激动剂阿朴吗啡,能使金鱼血清 GtH 含量降低,而腹腔注射多巴胺拮抗物 pimozide 或 metoclopramide,能使金鱼血清 GtH 含量增高。

虽然腹腔注射多巴胺使金鱼血清 GtH 含量降低,但 Peter 等发现在第三脑室注射多巴胺则对金鱼血清 GtH 含量没有影响^[30]。已经知道多巴胺在哺乳类不能越过血脑屏障;同样,金鱼对多巴胺似乎亦存在着血脑屏障,因为长期对金鱼腹腔注射放射性标志的多巴胺都没有发现积累在脑内。由于脑垂体位于血脑屏障之外,而金鱼的 GtH 细胞为神经原的轴突纤维所直接分布,在形态上这种神经原和胺能神经原相似。所以,从身体周围而不是从中枢神经系统给以的多巴胺能影响金鱼血清的 GtH 含量,这表明多巴胺是作用于血脑屏障之外的脑垂体以抑制 GtH 的分泌。

Peter 和 Chang 等^[13,13,14,35] 进行一系列离体和在体的试验以证明多巴胺直接作用于金鱼脑垂体以抑制 GtH 的自动分泌。在离体试验,用金鱼脑垂体的碎片或分散细胞在柱形的灌流系统中孵育,能大量自动释放 GtH;如果在灌流液中加入多巴胺,就会使 GtH 自动释放的量减少。在体内的试验,金鱼损伤视前区后由于内源 GRIF 被消除而使 GtH 自动分泌作用增强,从而使血清 GtH 含量增高;但如果对这些金鱼的腹腔注射多巴胺或阿朴吗啡,就会使损伤视前区导致升高的血清 GtH 含量降低。同样,金鱼腺垂体移植体有很高的 GtH 自动释放速率,使血清 GtH 含量明显升高;对这些鱼注射多巴胺或阿朴吗啡,亦会使接受腺垂体移植而导致升高的血清 GtH 含量明显降低。此外,多巴胺亦明显抑制由 m-GnRH-A 诱导金鱼的 GtH 分泌活动,因为腹腔注射多巴胺或阿朴吗啡,明显降低由于注射 m-GnRH-A 所刺激的血清 GtH 含量增加的幅度,而且这种抑制作用是剂量依存关系的。

另一方面,注射多巴胺的拮抗物 pimozide 或 metoclopramide,能明显增强 m-GnRH, m-GnRH-A 和 s-GnRH 诱导金鱼血清 GtH 含量增高的作用,而且这种增强作用亦是剂量依存关系的^[36]。

如果多巴胺是起 GRIF 的作用,则能阻抑多巴胺的合成或者使多巴胺从神经原突触前的神经纤维素末梢耗尽的药物都会影响到鱼类对注射 GnRH 后的反应性。事实上, Peter 等对金鱼和我们对大鳞副泥鳅的试验^[37,36] 都表明:腹腔注射 6-羟-多巴、利血平、 α -MPT、卡比多巴等都明显增强 m-GnRH-A 诱导 GtH 释放的作用。进一步证明多巴胺起着 GRIF 的作用。

免疫组织化学的研究表明:金鱼视前隐窝区的前腹视前围脑室核(NPP)存在着多巴胺能的核周体;这些多巴胺神经原通过在外侧视前区和前下丘脑的两侧神经束突入到脑垂体。这种多巴胺能的核(即细胞群)和神经通路的位置是和前面提到的通过电流损伤试验所确定的

GRIF 中心及其通道相一致。电流损伤破坏 GRIF 的神经通道之后亦使 GtH 细胞附近的多巴胺能神经末梢退化。这些结果都有力证明多巴胺对金鱼起着 GRIF 的作用^[37]。

许多研究已经证明硬骨鱼类卵母细胞的最后成熟和排卵是由于 GtH 大量而迅速的释放所诱导。对性成熟雌金鱼,注射多巴胺拮抗物 pimozide 不仅能增强 m-GnRH-A 刺激 GtH 分泌的作用,还能使血液 GtH 含量升高到自然产卵的水平并且诱导排卵,提高排卵率^[40,41,42]。所以,金鱼的排卵反应可能既取决于血液 GtH 含量升高的幅度,亦取决于含量升高的速率。因为血液 GtH 含量虽大量但缓慢的增加,如单独注射高剂量的 m-GnRH-A 或埋植含有高剂量 m-GnRH-A 小丸所引起的,并不能有效的诱导金鱼排卵^[46]。可见,在正常的鱼体情况下,清除多巴胺的抑制作用和增强 GnRH 对 GtH 分泌的刺激作用,对于迅速增加血液循环中 GtH 含量以发动排卵,都是必要的。

由于多巴胺对 GtH 分泌的抑制作用是经常存在,而注射 pimozide 后引起的血液基础性 GtH 含量升高和增强 m-GnRH-A 诱导的血液 GtH 含量升高的幅度,都和金鱼卵巢发育的程度有紧密联系,即卵巢退化的金鱼,血液 GtH 含量升高的幅度小,正在发育的卵巢,升高的幅度较大,而发育成熟并临近排卵的卵巢,升高的幅度最大;所以,可以认为多巴胺抑制 GtH 的作用强度随着卵巢发育的进展而增强^[41]。此外,金鱼视前区电流损伤引起血液 GtH 含量升高的幅度亦是随着性腺再发育的进展程度而增加。可认为多巴胺抑制作用强度的增强,是为了使金鱼在进入生殖季节面临着容易释放的 GtH 库增加时,能保持较低的血液循环 GtH 水平,以便在排卵时能有大量 GtH 迅速释放出来。

进一步的研究还表明多巴胺抑制 GtH 分泌的作用是通过多巴胺能受体,而不是通过 α -或 β -肾上腺素能受体^[37]。因为多巴胺及其激动剂阿朴吗啡和 bromocryptine 等,能抑制金体内 GtH 的自动释放以及由 GnRH 刺激的

GtH 释放;而多巴胺受体拮抗物 pimozi-
 de, metoclopramide, haloperidol, spiperone, domperidone
 等都能促使金鱼体内 GtH 的自动释放以及
 由 GnRH 刺激的 GtH 释放。相反,注射 α -
 肾上腺素能受体的拮抗物 phentolamine 或者
 β -肾上腺素能受体的拮抗物 propranolol 对金
 鱼血液 GtH 含量没有影响。由于 bromocryptine
 是特异性的多巴胺能 D-2 受体激动剂,而 pi-
 mozi- de, metoclopramide, spiperone, domperidone
 等又是特异性的多巴胺能 D-2 受体拮抗物,因
 此推测多巴胺在金鱼上可能是通过特异性的
 D-2 受体而实现其 GRIF 的作用。这和哺乳
 类的情况相似。

最近发表的研究结果表明多巴胺对 GtH
 自动释放和 GnRH 诱导 GtH 释放的抑制作用
 广泛存在于鲑形目、鲤形目、鳗形目和鲈形目
 的一些鱼类中^[5,6,17,18,20]。因此,可以说在全部硬骨
 鱼类都会是这样的。

五、在渔业生产中应用的前景

根据上述的理论研究成果,为了解决采用
 多巴胺拮抗物 pimozi- de 和消渴剂 reserpine 等,
 抑制多巴胺作为 GRIF 的作用从而增强 m-
 GnRH-A 诱导 GtH 释放和排卵的效应在鱼类
 人工繁殖生产中实际应用的问题,自 1983 年起
 以大鳞副泥鳅和鲤鱼做主要对象,同时亦对华
 南几种主要养殖鱼类:草鱼、鲢鱼、鳙鱼和长
 春鳊等进行研究,测定 pimozi- de 或 reserpine
 和 m-GnRH-A 的协同作用对促进 GtH 释放和
 诱导排卵的效应^[1,2,3,4,25,26,27]。研究结果和生
 产现场的应用性试验结果都表明:上述各种
 鱼类的促性腺激素分泌和排卵活动受 GnRH
 和 GRIF 的调节;采用多巴胺的拮抗物 pimo-
 zi- de 或者消渴剂 reserpine 均能显著增强
 m-GnRH-A 促进 GtH 分泌和诱导排卵的作用,
 并取得很好的催产效果,产出的鱼卵能正常
 受精,孵化和成活。因此,pimozi- de 加 m-
 GnRH-A 或者 reserpine 加 m-GnRH-A 是
 诱导草鱼、鲢鱼、鳙鱼、长春鳊、鲤鱼和大
 鳞副泥鳅等主要养殖鱼类的高效催产合剂。
 目前,这种新型催产

合剂已经通过技术鉴定并委托浙江省宁波市
 激素制品厂,进行小批量生产与推广试用。经
 过改进和完善之后会在鱼类人工繁殖生产中
 起重要作用。

参 考 文 献

- [1] 林浩然等,1984 多巴胺拮抗物 pimozi-
 de 和 LHRH-A 对长春鳊血清 GtH 含量和排
 卵影响。中山大学学报, (4): 122—126。
- [2] —, 1985 多巴胺拮抗物 PIM 增强丘
 脑下部促黄体释放激素类似物诱导大鳞副
 泥鳅排卵效应的研究,水生生物学报 9(1):
 74—79。
- [3] —, 1985 诱导大鳞副泥鳅排卵的多巴
 胺拮抗物和丘脑下部促黄体释放激素类似
 物的协同作用。水产学报 9(2): 165—170。
- [4] —, 1985 利血平和丘脑下部促黄体释
 放激素类似物 (LHRH-A) 对大鳞副泥鳅促
 性腺激素细胞的分泌活动和排卵的促进作
 用。动物学报 31(4): 313—318。
- [5] Billard, R. et al. 1983 Potentialisation
 par le pimozi- de des effets du LHRH-A sur
 la secretion gonadotrope hypophysaire l'ovu-
 lation et al spermiation chez la carpe com-
 mune (*Cyprinus carpio*). C. R. Acad. Sci.
 Paris, 296: 181—184。
- [6] ——— 1984 Advancement and synchro-
 nization of spawning in *Salmo gairdneri* and
Salmo trutta following administration of
 LHRH-A combined or not with pimozi- de.
Aquaculture, 43: 57—66。
- [7] Breton, B. et al. 1984 Dosage radio-
 immunologique homologue d'un facteur hypo-
 thalamique de stimulation de la fonction
 gonadotrope hypophysaire de Saumons-Gu-
 RH. C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Paris,
 Ser. III, 299: 383—388。
- [8] Burzawa-Gerard, E., 1982. Chemical
 data on pituitary gonadotropin and their
 implication to evolution. *Can. J. Fish. Aquat.
 Sci.* 39: 80—91。
- [9] Chang, J. P., and R. E. Peter. 1983a.
 Effects of dopamine on gonadotropin release
 in female goldfish, *Carassius auratus*.
Neuroendocrinology, 36: 351—357。
- [10] ——— 1983b. Effects of pimozi- de
 and des-Gly-(D-Ala⁶)-luteinizing hormone-
 releasing hormone ethylamide on serum
 gonadotropin concentrations, germinal vesicle
 migration and ovulation in female goldfish,
Carassius auratus. *Gen. Comp. Endocrinol.*
 52: 30—37。
- [11] Chang, J. P. et al., 1983. Influence of
 catecholamines on gonadotropin secretion in
 goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endo-
 crinol.* 49: 22—31。
- [12] ———, 1984a. Effects of dopamine
 and apomorphine on gonadotropin release
 from the transplanted pars distalis in goldfish.
Gen. Comp. Endocrinol. 55: 347—350。
- [13] ——— 1984b. Effects of catecholamin-
 ergic agonists and antagonists on serum
 gonadotropin concentrations and ovulation in
 goldfish: Evidence for specificity of dopamine
 inhibition of gonadotropin

- secretion. *Gen. Comp. Endocrinol.* **55**: 351—360.
- [14] ———— 1984c. Effects of dopamine and norepinephrine on in vitro spontaneous and gonadotropin-releasing hormone-induced gonadotropin release by dispersed cells or fragments of the goldfish pituitary. *Life Sci.* **35**: 2027—2033.
- [15] Crim, L. W. 1981. Control of gonadotropic hormone secretion (GtH) by the rainbow trout pituitary gland: Evidence of GtH inhibition by catecholamine and stimulation of GtH release by some other neuroregulatory factors. In "Neurosecretion" (D. S. Farner and K. Lederis, eds.), 442. Plenum, New York.
- [16] Crim, L. W. et al. 1983b. Accelerated ovulation by pelleted LHRH analogue treatment of spring-spawning rainbow trout (*Salmo gairdneri*) held at low temperature. *Aquaculture*, **35**: 299—307.
- [17] de Leeuw, R. et al. 1985a. Pimozide-LHRHa-induced breeding of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Aquaculture*, **44**: 295—302.
- [18] ———— 1985b. Pimozide modulates the luteinizing hormone-releasing hormone effect on gonadotropin release in the African catfish, *Clarias lazera*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **58**: 120—127.
- [19] Dufour, S., and E., Burzawa-Gerard, 1978. Evolution des hormones glycoproteiques hypophysaires donnees radioimmunologiques sur les souris unites de l'hormone gonadotrope de carpe (*Cyprinus carpio*). *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D*, **289**: 137—140.
- [20] Dufour, S. et al. 1984. Stimulation de la liberation d'hormone gonadotrope et du developpement des gonades sous l'effet conjugué du pimozide et d'un agoniste de la LHRH chez l'Anguille femelle argentee pretraitee a l'oestradiol. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Paris, Ser. III*, **299**: 231—234.
- [21] Fontaine, Y. A., and E. Burzawa-Gerard, 1978. Biochemical and biological properties of fish gonadotropin and their subunit: comparison with mammalian hormones. In "Structure and function of the gonadotropins" (M. W. McKerns, ed.). Plenum, New York. 361—380.
- [22] Idler, D. R., and T. B. Ng, 1979. Studies on two types of gonadotropins from both salmon and carp pituitaries. *Gen. Comp. Endocrinol.* **38**: 421—440.
- [23] ———— 1983. Teleost gonadotropin: isolation, biochemistry and function. In Hoar, W. S., Randall, D. J., Donaldson, E. M. (eds.): "Fish Physiology, Vol. 9: Part A". 187—222. Academic Press, New York.
- [24] King, J. A., and R. P. Millar, 1980. Comparative aspects of luteinizing hormone-releasing hormone structure and function in vertebrate phylogeny. *Endocrinology*, **106**: 707—717.
- [25] Lin, H. R. et al. 1985. Induction of ovulation in the loach (*Paramisgurnus dabryanus*) using pimozide and (D-Ala⁶, Pro⁹-N-ethylamide)-LHRH. *Aquaculture*, **46**: 333—340.
- [26] ———— 1985. The effects of LHRH analogue and drugs which block the effects of dopamine on gonadotropin secretion and ovulation in fish cultured in China. In "Proceedings of International Symposium on the Aquaculture of Carp and Related Species" (R. Billard ed.), INRA Publications, Versailles, France (in press).
- [27] ———— 1985. Pimozide and reserpine potentiate the effects of LHRH-Agonadotropin secretion and ovulation in cultivated fishes in China. In "Proceedings of Asian Symposium on Freshwater Fishculture", Beijing, China (in press).
- [28] Nagahama, Y., and R. E. Peter 1982. Effects of brain lesions on gonadotropin ultrastructure and serum gonadotropin levels in goldfish. *Cell Tissue Res.* **225**: 259—265.
- [29] Ng, T. B., and D. R. Idler 1979. Studies on two types of gonadotropins from both American plaice and winter flounder pituitaries. *Gen. Comp. Endocrinol.* **38**: 410—420.
- [30] Peter, R. E. 1982. Neuroendocrine control of reproduction in teleosts. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **39**: 48—53.
- [31] Peter, R. E. 1983. Evolution of neurohormonal regulation of reproduction in lower vertebrates. *Amer. Zool.*, **23**: 685—695.
- [32] Peter, R. E. 1983. The brain and neurohormones in teleost reproduction. In Hcar, W. S., Randall, D. J., Donaldson, E. M., (eds.): "Fish Physiology, Vol 9: Part A". New York, Academic Press, 97—135.
- [33] Peter, R. E., and C. R. Paulencu, 1980. Involvement of the preoptic region in gonadotropin release-inhibition in goldfish, *Carassius auratus*. *Neuroendocrinology*, **31**: 133—141.
- [34] Peter, R. E. et al. 1978. Lesioning studies on the gravid female goldfish: Neuroendocrine regulation of ovulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* **35**: 391—401.
- [35] ———— 1984. Gonadotropin release from the pars distalis of goldfish, *Carassius auratus*, transplanted beside the brain or into the brain ventricles: Additional evidence for gonadotropin-release-inhibitory factor. *Gen. Comp. Endocrinol.* **55**: 337—346.
- [36] ———— 1985. Structure-activity relationships of mammalian, chicken and salmon gonadotropin releasing hormones in vivo in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **58**: 231—242.
- [37] ———— 1986. Interactions of catecholamines and GnRH in regulation of gonadotropin secretion in teleost fish. Recent progress in Hormone Research (in press).
- [38] Sherwood, N. et al. 1983. Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**: 2794—2798.
- [39] Sherwoods, N. M. et al. 1984. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in striped mullet (*Mugil cephalus*), milkfish (*Chanos chanos*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*): comparison with salmon GnRH. *Gen. Comp. Endocrinol.* **55**: 174—181.
- [40] Sokolowska, M. et al. 1984. Induction of ovulation in goldfish, *Carassius auratus*, by pimozide and analogues of LHRH. *Aquaculture* **36**: 71—83.

(下转第 54 页)

(上接第 52 页)

- [41] ————— 1985a. Seasonal effects of pimozide and des-Gly¹⁰ (D-Ala⁶)-LHRH ethylanilide on gonadotropin secretion in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **57**: 472—479.
- [42] ————— 1985b. The effects of different doses of pimozide and (D-Ala⁶, Pro⁹-N-ethylamide)-LHRH (LHRH-A) on gonadotropin release and ovulation in female goldfish. *Can. J. Zool.* **63**: 1252—1256.
- [43] Van Oordt, P. G. W. J., and J. Peute. 1983. The cellular origin of pituitary gonadotropin in teleosts. In Hoar, W. S., Randall, D. J., Donaldson, E. M. (eds): "Fish Physiology, Vol. 9, Part A", 137—186. Academic Press, New York.
- [44] Yoneda, T. et al. 1977. Amino acid composition of chum salmon gonadotropin. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **43**: 1451—1454.