

促性腺激素诱发大西洋鲑卵黄 发生期卵巢滤泡释放性 类固醇激素的离体研究

赵维信

(上海水产大学)

R.S.Wright

(DAFS Marine Laboratory, Aberdeen, U.K.)

提要 应用大麻哈鱼 (*Oncorhynchus keta*) 促性腺激素 (GTH) 诱发大西洋鲑 (*Salmo salar*) 卵黄发生期的离体卵巢滤泡 (直径为 3.4 毫米) 产生性类固醇激素的研究表明, 不论用 0.1 或 1 微克/毫升 GTH 刺激, 经培育 10 天后, 未出现卵母细胞卵核消失的现象, 卵核偏位也不明显。对培养液中 $17\alpha, 20\beta$ -双羟孕酮 ($17\alpha, 20\beta\text{P}$) 的积累浓度测定结果, 仅 1 微克/毫升 GTH 组含少量的 $17\alpha, 20\beta\text{P}$; 0.1 微克/毫升 GTH 组, 培养液中雌二醇的积累浓度明显高于对照组和 1 微克/毫升 GTH 组, 并为后者的两倍。除雌二醇外, 孕酮, 17α -羟孕酮, $17\alpha, 20\beta\text{P}$, 雄烯二酮和睾酮的产生, 都呈现对 GTH 剂量的依赖关系, 1 微克/毫升 GTH 组的产生量明显高于 0.1 微克/毫升 GTH 组和对照组。离体研究的结果表明, 处于卵黄发生期的卵巢滤泡对低剂量 (0.1 微克/毫升) 和高剂量 (1 微克/毫升) GTH 的反应不同。低浓度的 GTH, 引起性类固醇激素生物合成的途径沿着形成雌二醇的方向进行, 雄激素被芳香化成雌激素, 雌二醇再而刺激肝脏合成卵黄物质的前体, 从而促进卵黄发生。高浓度的 GTH, 有抑制雌二醇合成的作用, 而是促使卵母细胞向着最终成熟的方向发展, 使性类固醇生物合成的途径转向形成大量雄激素和孕激素, 特别是 $17\alpha, 20\beta\text{P}$ 。这与已充分生长和卵黄积累完成的卵巢滤泡离体试验的结果一致, 与活体观察以上各种性类固醇激素的变化一致。

主题词: 大西洋鲑、卵黄发生期卵巢滤泡、促性腺激素、性类固醇激素。

硬骨鱼类与其它卵生脊椎动物相似, 雌二醇的主要作用是诱发肝脏合成和分泌卵黄蛋白的前体—磷蛋白和磷脂^[5]。卵母细胞的卵黄发生与血液中雌二醇浓度的不断升高密切相关^[4,7,11]。虹鳟在卵黄发生初期, 注射 GTH 后, 血浆中雌二醇浓度升高^[8]。然而, 自然情况下, 鲑鳟鱼类和鲤科鱼类在卵黄发生时期, 血液中 GTH 的含量并不高, 随着性腺发育 GTH 的升高也不明显^[9,7]。但在卵母细胞最终成熟、排卵和产卵阶段, 血液中 GTH 明显升高^[1,2,6,13,16], 而雌二醇却处于不断下降的状况^[8,13,14]。近年来, 应用离体培育技术, 证实 GTH 能刺激孟苏大麻哈鱼 (*Oncorhynchus rhodurus*) 卵黄发生期的卵巢滤泡产生雌二醇^[10,13], 刺激充分生长的卵巢滤泡产生 $17\alpha, 20\beta\text{P}$ ^[13]。1982 年 11 月底, 我们进行了大西洋鲑充分生长的 (晚期) 卵巢滤泡的离体培育^[10], 应用大麻哈鱼 (*O. keta*) 促性腺激素 (GTH) 诱发产生性类固醇激素的研究, 发现 GTH 明显刺激雄烯二酮, 睾酮, 17α -羟孕酮

和 $17\alpha 20\beta P$ 的产生, 卵母细胞发育至卵核消失, 而 GTH 对孕酮和雌二醇的产生却影响不大。在此基础上, 为进一步了解卵黄发生期卵巢滤泡对 GTH 的反应与充分生长的卵巢滤泡对 GTH 的反应有何差别, 以及对不同剂量 GTH 的反应状况。因此继而进行了本研究, 试图了解 GTH 诱发卵黄发生期卵巢滤泡产生和释放性类固醇激素的状况, 以阐明 GTH 如何通过诱发性激素的产生, 从而调节卵黄发生。

材料与方 法

试验鱼 大西洋鲑 (*Salmo salar*) 于 1983 年九月购自英国苏格兰西海岸海水养殖场, 暂养在室外水族箱内, 维持送气流水和自然光照。10 月 12 日取自一条大西洋鲑的卵巢滤泡, 直径为 3.4mm 左右。经透明处理后, 观察卵核的位置, 均位于卵母细胞的中央部位。这批鱼于 1984 年 1 月初相继排卵, 卵母细胞直径为 $5.51 \pm 0.23\text{mm}$ 。

离体培育 试验分三组, 每组为 2 个三角培养瓶, 各放入 50 粒滤泡, 浸浴在 4 ml 培养液中(鱒平衡盐溶液和 HEPES-NaOH 缓冲液, 培养液含 2% 青霉素和链霉素。第一组培养液中加入 $1\mu\text{g/ml}$ 大麻哈鱼 GTH(高剂量组), 第二组培养液中加入 $0.1\mu\text{g/ml}$ 大麻哈鱼 GTH(低剂量组), 第三组为不含 GTH 的对照组。6°C 培育 10 天。培育开始后, 分别在 0, 4, 16 小时和 2, 4, 6, 8, 10 天进行培养液取样, 每次为 0.2ml。样品冻结保存待测定。

放射免疫测定 样品不经抽提和纯化, 直接进行测定。20 μl 培养液样品, 用测定缓冲液稀释至 1ml, 然后取稀释液 0.2ml 进行常规放射免疫测定^[15]。

结 果

卵巢滤泡经培育 10 天后, 检查卵母细胞卵核的位置。不论 $1\mu\text{g/ml}$ GTH、 $0.1\mu\text{g/ml}$ GTH 或对照组, 都未发生卵核消失, 卵核仍然位于卵母细胞中心。

培育过程中, 在各个取样点上, 培养液中六种性类固醇激素: 孕酮, 17α -羟孕酮, $17\alpha 20\beta P$, 雄烯二酮, 睾酮和雌二醇的积累浓度见图 1。

$17\alpha 20\beta P$ 仅在 $1\mu\text{g/ml}$ GTH 组检测到, 在 GTH 刺激下, 培育两天后, 培养液中才开始出现 $17\alpha 20\beta P$, 培育第 6—10 天, 被释放的 $17\alpha 20\beta P$ 明显增加, 第 10 天的积累浓度为 73.8ng/ml 。

GTH 刺激 17α -羟孕酮产生, 呈现对 GTH 剂量的依赖关系, $1\mu\text{g/ml}$ GTH 组, 培养液中 17α -羟孕酮的含量明显高于 $0.1\mu\text{g/ml}$ GTH 组和对照组。 $1\mu\text{g/ml}$ GTH 组, 17α -羟孕酮的积累浓度至第六天后逐渐下降。

GTH 刺激孕酮产生, 而且孕酮产生的量呈现对 GTH 刺激剂量的依赖关系。 $1\mu\text{g/ml}$ GTH 组, 孕酮浓度在第四天达到最大值。从图 1 可见, 以上三种孕激素中, GTH 首先诱发孕酮产生, 其峰值出现早于 17α -羟孕酮和 $17\alpha 20\beta P$, 然后出现 17α -羟孕酮的峰值, 而 $17\alpha 20\beta P$ 的大量产生是继 17α -羟孕酮峰值之后。三者之间反映了生物合成途径中, 前体与产物之间的关系。

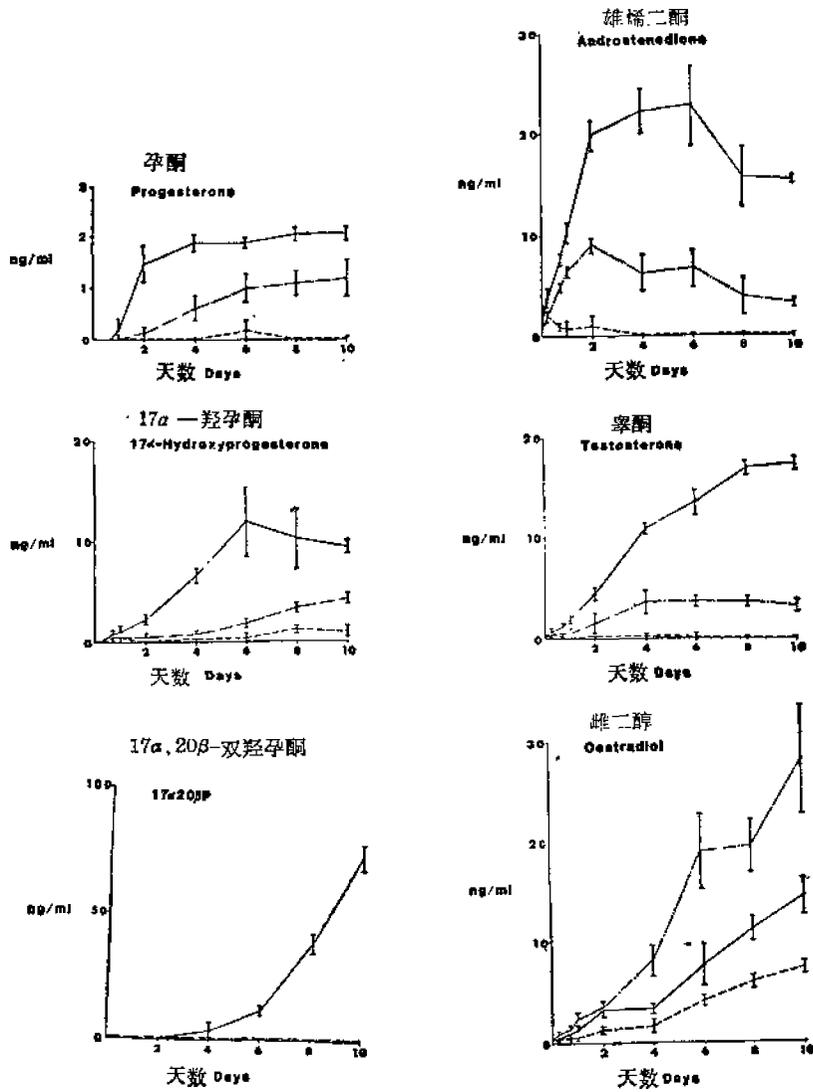


图 1 大麻哈鱼 (*Oncorhynchus keta*) 促性腺激素 (GTH) 诱发大西洋鲑 (*Salmo salar*) 卵黄发生期的卵巢滤泡产生性类固醇激素的过程。

Fig. 1 The steroid release by vitellogenic follicles of Atlantic salmon incubated *in vitro* with a purified preparation of Pacific salmon gonadotropin (GTH).

— GTH 含量为 1 μg/ml (with 1 μg/ml GTH)
 - - - GTH 含量为 0.1 μg/ml (with 0.1 μg/ml GTH)
 ···· 无 GTH (without GTH)

GTH 明显刺激了两种雄激素, 雄烯二酮和睾酮的产生, 两者的合成都呈现了对 GTH 刺激剂量的依赖关系。雄烯二酮在培育的第一、二天内迅速大量合成, 达到峰值。而睾酮的合成, 在培育第二天后明显增加。两者之间也显示出前体和产物的相互关系。

GTH 刺激了雌二醇的产生, 但雌二醇的合成量并不呈现对 GTH 刺激剂量的依赖关系, 0.1 μg/ml GTH 组所产生的雌二醇的量 > 1 μg/ml GTH 组 > 对照组。0.1 μg/ml GTH 组, 培养液中雌二醇的浓度为 1 μg/ml GTH 组的 2 倍, 为对照组的 4 倍。

讨 论

离体研究的结果指出,处于卵黄发生期的卵巢滤泡,对低剂量(0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和高剂量(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)GTH刺激的反应不同。高剂量GTH组诱发产生的雌二醇明显比低剂量组为低,而产生的17 α 20 β P却高于低剂量组(见图1)。这说明大量GTH的刺激,引起性类固醇生物合成途径向着合成大量雄激素和孕激素,特别是形成17 α 20 β P的方向进行;而低浓度GTH的刺激,则使性类固醇生物合成的途径向着合成雄激素,雄激素又在芳香酶的作用下转化成雌激素,特别是形成雌二醇的方向进行。培养液中几乎不存在17 α 20 β P。这与活体观察的结果相一致。血液中雌二醇和GTH含量年周期变化的研究指出,不论鲤科鱼类^[8]或鲢鳙鱼类^[8,4,7,11]血清中雌二醇的含量随卵黄发生而逐渐升高,至卵黄发生结束,雌二醇浓度达到峰值;而GTH浓度随性腺发育变化不大或仅略微升高。相对来说,血液中GTH浓度一直维持在一个低水平^[8,7],17 α 20 β P的浓度也极低^[17]。当性腺成熟,卵黄积累完成,血液中雌二醇浓度下降^[9,13],睾酮浓度上升^[18,14]。临近排卵、产卵时,GTH浓度迅速上升,甚至是近十倍(鲢鳙鱼类^[6,8,18])或数十倍(鲤科鱼类^[1,2,3,16])地增加,同时17 α 20 β P浓度也迅速升高^[17,15]。

从本试验中不同剂量GTH对早期(卵黄发生期)卵巢滤泡诱发性激素所产生的作用和以前发表的关于GTH诱发晚期(充分生长的)卵巢滤泡合成和释放性激素的研究^[20]报告可以推知,自然生理情况下,卵黄发生阶段血液中的促性腺激素—Con AII(为一种糖蛋白)^[9]刺激卵巢滤泡组织合成雌二醇,继而雌二醇诱发肝脏合成卵黄蛋白前体,由于促性腺激素—Con AI(为一种非糖蛋白)^[9]的作用,使卵黄蛋白前体转移到卵母细胞中。当卵母细胞卵黄发生完成后,可能由于一种芳香酶抑制因子的形成^[12],使卵巢滤泡颗粒细胞中的芳香酶活力减弱,雌二醇合成减少,从而降低了雌二醇对垂体的负反馈作用。因此垂体促性腺激素的分泌不断增加,刺激了成熟诱发激素—17 α 20 β P大量合成,使卵母细胞达到最终成熟。

本试验中,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GTH组虽然诱发产生一定量的17 α 20 β P,但这与1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GTH刺激晚期卵巢滤泡产生17 α 20 β P的量^[20]相比,则显得很低。后者在培育第八天,培养液中17 α 20 β P的积累浓度为300 ng/ml以上,而前者在培育第八天的17 α 20 β P积累浓度仅为34 ng/ml,第十天为73 ng/ml。无论如何,本结果反映了在大剂量GTH刺激下,有迫使较晚期的卵黄发生期卵巢滤泡合成17 α 20 β P的可能性。由于处于卵黄发生期的卵母细胞卵径过小,即使能实现诱导排卵,受精后孵化出的鱼苗,体质不够健壮,将给以后的生长带来一定的困难,所以生产上价值不大。而对性腺发育不够好的亲鱼或为了促进性腺更快发育,注射低剂量GTH是可行的。从研究的结果看,使用GTH的量宜低不宜高。因为注射低剂量GTH的效果与自然状况下正在进行的生理变化较一致,能促使雌二醇合成增加,加速卵黄发生,达到协调地促进性腺发育的效果。如若注射GTH的量过高,则会有打乱原有生理状况的可能,使卵巢改变合成类固醇激素的途径,从而出现不同的生理效应,使雌二醇正常合成受抑制,而转向合成17 α 20 β P。可能由于17 α 20 β P的不断增加过早地引起卵母细胞吸水,从而使卵母细胞的最终成熟、排卵和产卵过程不协调,造成滞产或亲鱼死亡。

GTH 明显刺激孕酮, 17α -羟孕酮, 雄烯二酮和睾酮的合成, 而且随 GTH 剂量的增加, 合成量也明显增加。与对照组相比, GTH 的刺激是必不可少的。以上四种起源于卵巢滤泡组织的性类固醇激素, 在大西洋鲑卵黄发生期中的作用, 看来是作为合成雌二醇的前体而存在的。

因此可以得出结论, 从 GTH 能刺激离体卵巢滤泡合成孕酮, 17α -羟孕酮, $17\alpha 20\beta P$, 雄烯二酮, 睾酮和雌二醇, 证实这些性类固醇激素起源于卵巢滤泡。卵黄发生期卵巢滤泡对外源高剂量和低剂量 GTH 的刺激反应不同。在生理状况下, 卵黄发生期卵巢滤泡在低浓度 GTH 作用下, 通过刺激合成雌二醇间接控制卵黄发生。

参 考 文 献

- [1] 赵维信, 黄世蕉, 姜仁良, 1979. 鲤鱼产卵前后血清中促性腺激素含量的变动. 动物学杂志, 2:3-5.
- [2] 姜仁良, 黄世蕉, 赵维信, 1980. 草、鲢鱼产卵前后血清中促性腺激素含量的变动. 水产学报, 4(2):129-133.
- [3] Billard, R., Breton, B., Fostier, A., Jalabert, B. and Weil, C. 1978. Endocrine control of the teleost reproductive cycle and its relation to external factors: Salmonid and Cyprinid models. In "Comparative Endocrinology". (P. J. Gaillard and H. H. Beer eds.) pp. 37-48, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- [4] Bohemen, C. G. van. and Lambert, J. G. D. 1981. Estrogen synthesis in relation to estrone, estradiol and vitellogenin plasma levels during the reproductive cycle of the female rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 45, 105-114.
- [5] Chester, J. I., Bellamy, D., Chan, D. K. O., Follet, B. K., Henderson, I. W., Phillips, J. G. and Smart, R. S. 1972. Biological actions of steroid hormones in nonmammalian vertebrates. In "Steroids in Nonmammalian Vertebrates" (D. R. Idler, ed.) pp. 414-480. Academic Press, New York.
- [6] Crim, L. W., Meyer, R. K. and Donaldson, E. M. 1973. Radioimmunoassay estimates of plasma gonadotropin levels in spawning pink salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 21, 69-76.
- [7] Crim, L. W. and Idler, D. R. 1978. Plasma gonadotropin, estradiol and vitellogenin and gonadophosvitin levels in relation to the seasonal reproductive cycles of female brown trout. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 18, (4) 1001-1005.
- [8] Fostier, A., Weil, C., Terqui, M., Breton, T. B., Jalabert, B. 1978. Plasma estradiol- 17β and gonadotropin during ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 18, (4), 929-936.
- [9] Ng, T. B. and Idler, D. R. 1983. Yolk formation and differentiation in teleost fishes. In "Fish Physiology" (W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson) Vol. IX. Reproduction, Part A. pp. 373-397. Academic Press, New York.
- [10] Kagawa, H., Young, G. and Nagahama, Y. 1982. Estradiol- 17β production in isolated amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) ovarian follicles and its stimulation by gonadotropins. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 47, 361-365.
- [11] Lambert, J. G. D., Bosman, G. I. C. G., M., Hurk, R. V. D. and Oordt, P. G. W. J. V. 1978. Annual cycle of plasma oestradiol- 17β in the female trout, *Salmo gairdneri*. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* 18(4), 923-927.
- [12] Manning, N. J. and Kime, D. E. 1984. Temperature regulation of ovarian steroid production in the common carp, *Cyprinus carpio* L., *in vivo* and *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 56, 376-388.
- [13] Scott, A. P., Sumpter, J. P. and Hardiman P. A. 1983. Hormone changes during ovulation in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 49, 128-134.
- [14] Scott, A. P., MacKenzie, D. S. and Stacey, N. E. 1984. Endocrine changes during natural spawning in the white sucker, *Catostomus commersoni*. II. Steroid hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 56, 349-359.
- [15] Simpson, T. H. and Wright, R. S. 1977. A radioimmunoassay for 11-oxotestosterone: its application

- in the measurement of levels in blood serum of rainbow trout (*S. gairdneri*). *Steroids*, 29,383-398.
- [16] Stacey, N. E., Cook, A. F. and Peter, R. E. 1979. Ovulatory surge of gonadotropin in the goldfish, (*Carassius auratus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 37, 246-249.
- [17] Young, G., Crim, L. W., Kagawa, H., Kambegawa, A. and Nagahama, Y. 1983. Plasma $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one levels during sexual maturation of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*): Correlation with plasma gonadotropin and *in vitro* production by ovarian follicles. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 51, 96-105.
- [18] Young, G., Ueda, H. and Nagahama, Y. 1983. Estradiol- 17β and $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one production by isolated ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) in response to mammalian pituitary and placental hormones and salmon gonadotropin. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 52, 329-335.
- [19] Wright, R. S. and Hunt, S. M. V. 1982. A radioimmunoassay for $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one. its use in measuring changes in serum levels at ovulation in Atlantic salmon (*Salmo salar*), coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 47, 475-482.
- [20] Zhao, W. X. and Wright, R. S. 1985. The course of steroid release by intact ovarian follicles of Atlantic salmon (*Salmo salar*) incubated *in vitro* with and without gonadotrophin. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 57, 274-280.

SEX STEROIDS PRODUCTION BY VITELLOGENIC OVARIAN FOLLICLES OF ATLANTIC SALMON(*SALMO SALAR*) IN VITRO

Zhao weixin

(Shanghai Fisheries University, Shanghai, China)

R. S. Wright

(DAFS Marine Laboratory, Aberdeen, U. K.)

ABSTRACT The effects of salmon gonadotrophin (GTH) on production of progesterone, 17α -hydroxyprogesterone, $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17\alpha 20\beta$ P), androstenedione, testosterone and estradiol by vitellogenic ovarian follicles of Atlantic salmon (*Salmo salar*) *in vitro* were examined. The breakdown of germinal vesicle of oocyte did not occur in both incubations with 0.1 and $1\mu\text{g/ml}$ GTH, only small amount of $17\alpha 20\beta$ P was produced by $1\mu\text{g/ml}$ GTH incubation at the 10th day. The follicles with $0.1\mu\text{g/ml}$ GTH produced two-fold amount of oestradiol than that with $1\mu\text{g/ml}$ GTH incubation. Progesterone, 17α -hydroxyprogesterone, androstenedione and testosterone were produced by the stimulation of GTH in a dose-dependent manner. The results indicate that vitellogenic follicles show different responses to low or high dose of GTH stimulation. Oestradiol production is the major biosynthesis pathway of sex steroids by late vitellogenic follicles in Atlantic salmon and it is responsible for oocyte vitellogenesis. A low dose of GTH is more effective on stimulating oestradiol production.

KEY WORDS Atlantic salmon (*Salmo salar*), Vitellogenic ovarian follicles, Gonadotrophin, Sex steroids.