

E₂ 对鲤鱼生长激素分泌的影响: 离体研究^{*}

李文笙 林浩然

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要 采用离体灌流孵育的方法研究了 1 β -雌二醇 (E₂) 对鲤鱼脑垂体生长激素 (GH) 分泌的影响. 结果表明: 1 μ mol/L E₂ 作用于性腺成熟期鲤鱼脑垂体碎片 30 min 后, GH 基础分泌显著提高, 2 h 后达到最大值, 随后逐步下降, 4 h 后 GH 基础分泌水平与作用前无显著性差异. 用 E₂ (1 μ mol/L) 进行 10~12 h 的过夜孵育, GH 的基础分泌无显著性变化, 但影响了脑垂体对 LHRH-A 和 TRH 刺激的反应性, 对前者有抑制作用, 对后者有促进作用.

关键词 1 β -雌二醇, 生长激素, 促性腺激素释放激素类似物, 促甲状腺素释放激素, 灌流孵育, 鲤鱼

分类号 Q 575. 11; Q 579. 13

鱼类生长激素 (GH) 的分泌具有明显的季节性差异^[1], 这与鱼类性腺成熟状态的周期性变化有密切关系, 因而也与鱼体性类固醇激素水平的变化密切相关. 性类固醇激素对生长激素分泌的调控机制有 3 种可能的模式: 直接作用于脑垂体; 或者是通过对下丘脑的影响而间接产生作用; 抑或是前二者兼有. 采用离体研究的方法有助于进一步了解性类固醇激素的作用模式. 在哺乳类和鸟类中已有这方面的报道. 大鼠中的研究发现 1 β -雌二醇 (E₂) 能促进基础 GH 的分泌和提高 GH 分泌细胞对 GRF 的反应性; 且这些结果并不依赖于 GRF 作用^[2], 这表明 E₂ 提高血浆中 GH 水平的作用至少部分是直接在脑垂体水平上进行调节. 而在鱼类, 有关性类固醇激素调节 GH 分泌的作用的研究仍是采用在体^[1], 或是在体后离体的方法进行研究^[1]. 这些实验难以阐明性类固醇激素影响 GH 分泌的机制, 完全用离体方法来探讨性类固醇激素对鱼类 GH 分泌的调控机制的研究尚未见报道.

本文采用了离体实验的方法, 对鲤鱼脑垂体碎片进行灌流孵育, 旨在了解不同时间的 E₂ 刺激对脑垂体基础 GH 分泌的影响, 以及在 E₂ 的影响下鲤鱼脑垂体碎片对促性腺激素释放激素类似物 (LHRH-A) 和促甲状腺素释放激素 (TRH) 的反应性.

1 材料和方法

(1) 实验动物: 鲤鱼 (*Cyprinus carpio*), 体质量 750~1 200 g, 购自广州农贸市场. 实验中全部采用雌性鲤鱼, 取材于 1997 年 1 月至 2 月, 性腺发育处于成熟阶段, 性腺成熟系

* 广东省自然科学基金 (950098) 资助项目

收稿日期: 1997-09-16 李文笙, 女, 29 岁, 博士研究生.

数 (GSI) 为 15.6%~25.4%。实验前, 鲤鱼在室温和自然光周期下暂养于室内水族箱中 3~5 d。

(2) 试剂: 合成的 LHRH-A (宁波激素药厂) 和 TRH (Sigma) 分别用 HBSS 配成 10 和 $100 \mu\text{mol/L}$ 贮存液, 使用前用 HBSS 稀释。配制雌二醇 (Sigma) 先用少量乙醇 ($\text{h} = 95\%$) 使之溶解, 再用 M199 或 HBSS 稀释成所需的浓度, 对照组的孵育液也含有相应量的 h 为 95% 乙醇。

(3) 鲤鱼脑垂体碎片的离体灌流孵育: 参见文献 [3]。

(4) 实验设计: 实验 1 鲤鱼脑垂体碎片在预灌流后, 除对照组外, 其余均引入 $1 \mu\text{mol/L}$ 的 E_2 持续性刺激, 每 10 min 收集 1 管, 连续测试每 30 min 内 E_2 刺激对基础 GH 分泌的影响, 共测试 4 h。实验重复 3 次。持续性 E_2 刺激对脑垂体碎片基础 GH 分泌的影响的计算参照 Habibi 等 [4], 稍作修改。引入刺激前的 3 管 (30 min) 样品的激素含量平均值作为刺激前基础分泌值, E_2 持续性刺激对基础 GH 分泌的影响定量为持续反应期间每 30 min 内收集的各反应的激素含量平均值, 再把此值转化为引入 E_2 前基础 GH 分泌值的百分数; 实验 2 在预灌流液 M199 和 HBSS 中分别加入 $1 \mu\text{mol/L}$ E_2 , 对照组中不加, 鲤鱼脑垂体碎片在预灌流后以 1 h 的间隔接受 $\times 5 \text{ min}$ 的 LHRH-A 脉冲式刺激, 剂量为 1, 10, 100 nmol/L, 2 次脉冲刺激之间的灌流液采用 HBSS+ $1 \mu\text{mol/L}$ E_2 (对照组则不含 E_2)。实验重复 3 次。脑垂体碎片对脉冲式 LHRH-A 刺激的激素分泌反应值的计算参见文献 [3]; 实验 3 在预灌流液 M199 和 HBSS 中分别加入 $1 \mu\text{mol/L}$ E_2 , 对照组中不加, 鲤鱼脑垂体碎片在预灌流后以 1 h 的间隔接受 $\times 5 \text{ min}$ 的 TRH 脉冲式刺激, 剂量依次为 0.1, 30, 100 nmol/L, 2 次脉冲刺激之间的灌流液采用 HBSS+ $1 \mu\text{mol/L}$ E_2 (对照组则不含 E_2)。实验重复 3 次。脑垂体碎片对脉冲式 TRH 刺激的激素分泌反应值的计算同实验 2。

(5) 激素测定和数据分析方法: 样品中的 GH 含量测定采用鲤鱼 GH 的放射免疫测定方法。每组数据以平均值 \pm 标准差表示。显著性检验采用 t 检验, 当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 实验结果

2.1 不同时间的 E_2 刺激对基础 GH 分泌的影响

鲤鱼脑垂体碎片经过 10~12 h 预灌流后, 用 $1 \mu\text{mol/L}$ E_2 对其进行 4 h 的持续性刺激。结果如图 1 所示。在 E_2 $1 \mu\text{mol/L}$ 引入的 30 min 内, 鲤鱼脑垂体 GH 的基础分泌有显著性提高 ($P < 0.05$), 达到 $(200.9 \pm 43) \text{ ng/mL}$, 是引入刺激前的 2 倍; 引入刺激 2 h 后, GH 的基础分泌达到最高值 $(377.8 \pm 99.5) \text{ ng/mL}$, 是引入刺激前的 3.6 倍, 该反应值也显著高于引入刺激 30 min 后的反应值 ($P < 0.05$)。随后 GH 的基础分泌出现下降趋势, 在引入 E_2 4 h 后, 该值为 $(188.6 \pm 65.2) \text{ ng/mL}$, 与引入 E_2 前的 GH 基础分泌无显著性差异。

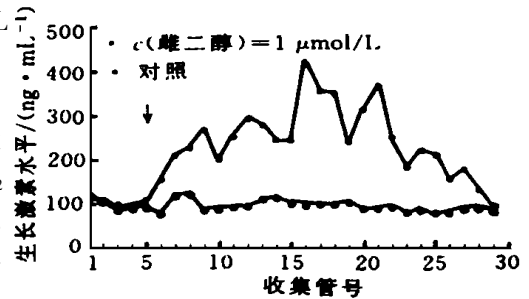


图 1 E_2 影响基础 GH 分泌的代表性进程
Fig. 1 GH releasing profiles in representative perfusion columns with pituitary fragments treated with E_2 for continuous stimulation during perfusion with HBSS 箭头代表持续性 E_2 刺激的引入, 对照组不引入 E_2 刺激

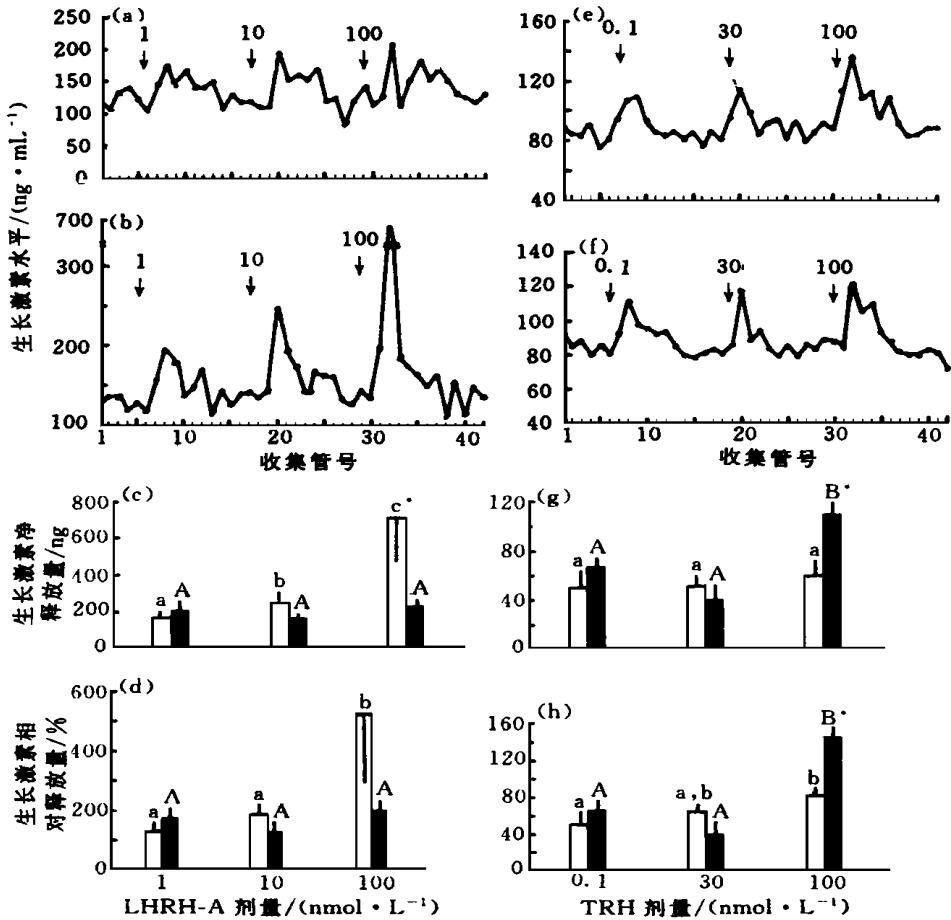


图 2 E₂ (1 μmol/L) 对不同浓度 LHRH-A 和 TRH 刺激的 GH 分泌的影响和代表性进程

Fig. 2 GH releasing profiles in representative perfusion columns with pituitary fragments treated with LHRH-A and TRH

(a, e) E₂ 作用组; (b, f) 对照组; (c, g) 表示在基础值之上的 GH 分泌的净反应值 (ng); (d, h) 表示 GH 分泌的实际增加的比例; * 表示与对照组之间有显著性差异 (P < 0.05); 含有相同字母标记的实验组之间无显著性差异

2.2 E₂ 对 LHRH-A 脉冲刺激促进的 GH 分泌的影响

结果如图 2 (a~ d) 所示, 实验组中, 鲤鱼脑垂体碎片经过 10~ 12 h 的 HBSS+ E₂ (1 μmol/L) 预灌流后, GH 的基础分泌值与对照组 (只经过 10~ 12 h 的 HBSS 预灌流) 无显著性差异; 在对照组中, LHRH-A 的脉冲式刺激以显著的剂量依存关系刺激 GH 分泌 (P < 0.05). 在实验组中, LHRH-A 刺激 GH 分泌的剂量依存关系并不显著, 高剂量 LHRH-A 刺激 GH 分泌的净反应显著低于对照组 (P < 0.05).

2.3 E₂ 对 TRH 脉冲刺激促进的 GH 分泌的影响

结果如图 2 (e~ h) 所示, 实验组中, 鲤鱼脑垂体碎片经过 10~ 12 h HBSS+ E₂ (1 μmol/L) 预灌流后, GH 的基础分泌值与对照组 (只经过 10~ 12 h HBSS 预灌流) 也无显著性差异, 与结果 2.2 相似; 在对照组中, TRH 脉冲刺激以剂量依存关系促进 GH 的分泌. 实验

组中, TRH脉冲刺激同样以剂量依存关系促进 GH的分泌, 并且高剂量 TRH (100 nmol/L) 刺激 GH分泌的作用比没有 E_2 参与的状态下显著提高 80% ($P < 0.05$).

3 讨 论

一般认为类固醇激素的作用机制是基因调节, 亦即通过影响基因的表达, 改变物质的生物合成来实现其作用. 但在哺乳类中发现当睾酮作用于大白鼠的前列腺时, 它参与了靶组织中活性物质的分泌过程, 这个作用过程并不依赖于基因调节^[5]. 本实验中含有 $1\mu\text{mol/L}$ E_2 的孵育液作用 30 min后, 使鲤鱼脑垂体碎片分泌的基础 GH有显著提高, 推测在这个过程中, E_2 可能直接参与了 GH的分泌活动的调节. 此外, 本实验中还发现, GH的基础分泌值在 E_2 ($1\mu\text{mol/L}$) 持续刺激 4 h后与引入前无显著性差异, 这与本文实验 2, 3中, 用含 E_2 ($1\mu\text{mol/L}$) 的灌流液预灌流过夜 (10~ 12 h) 后, GH基础值与对照组并无显著性差异是一致的 (图 2 (a, b, e, f)). 表明在 10~ 12 h内 E_2 所起的作用与开始的 2 h内对脑垂体 GH的基础分泌所起的作用可能是不一样的, 其中的机制还有待探讨. Lo等^[6]用睾酮 (T) 对金鱼脑垂体细胞进行过夜预灌流后发现, GH的基础分泌并无显著性变化, 与本文中 GH的情况相似.

已有的研究表明, GnRH及其人工合成的类似物 (LHRH-A)除了调节鱼类脑垂体 GH的分泌以外, 同样也调节 GH的分泌^[1]. 实验 2对照组中, LHRH-A以显著的剂量依存关系促进 GH的分泌, 也再次证明了这一点. 处于性腺退化期或性腺成熟早期的金鱼经过埋植 E_2 处理后, 脑垂体碎片在 sGnRH刺激后的 GH分泌量比对照组提高了 4倍^[1]. 而在本文的性腺成熟期鲤鱼中, E_2 对 LHRH-A刺激的 GH分泌有抑制作用, 这可能与本实验中鱼的性腺发育所处的状态有关. E_2 对下丘脑-垂体轴的反馈作用与鱼的性腺发育状态密切相关^[7]. 这一点在 GH中已经比较清楚, 正反馈调节一般存在于性腺处于退化期或未成熟期的鱼中, 而对于性腺处于成熟期的鱼, 性类固醇激素产生负反馈调节^[8]. 在 E_2 调节 GH分泌方面是否也有类似的机制? 有待进一步验证.

金鱼的在体实验中证明不同性腺发育状态下, TRH刺激 GH分泌的作用是不同的, TRH的作用在性腺成熟期 10倍高于性腺退化期^[1]. 本文采用性腺成熟期的鲤鱼再次证明 TRH能以剂量依存关系刺激鲤科鱼类脑垂体 GH的分泌, 同时 E_2 的存在促进 TRH刺激 GH分泌的作用, 并且在 TRH100 nmol/L时促进作用显著.

实验结果表明: E_2 能在脑垂体水平上对 GH基础分泌以及 LHR和 TRH刺激的 GH分泌进行一定的调节. 但这可能并不是唯一的调控机制, 性类固醇激素对 GH分泌的调节可能是下丘脑水平与垂体水平上分别调控的整合的结果.

参 考 文 献

- 1 Trudeau V L, Somoza G M, Nahorniak C S, et al. Interactions of estradiol with gonadotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone in the control of growth hormone secretion in the goldfish. *Neuroendocrinology*, 1992, 56: 483~ 490
- 2 Simard J, Hubert J F, Housseinzadeh T, et al. Stimulation of growth hormone release and synthesis by estrogens in rat anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology*, 1986, 119: 2004~ 2011

- 3 林信伟, 林浩然. 鲑鱼促性腺激素释放激素 (sGnRH) 调节鲤鱼脑垂体生长激素分泌的离体研究. 动物学报, 1994, 40: 30~38
- 4 Habibi H R, Marchant T A, Nahornink C S, et al. Functional relationship between receptor binding and biological activity for analogs of mammalian and salmon gonadotropin-releasing hormones in the pituitary of goldfish (*Carassius auratus*). Biol Reprod, 1989, 40: 1152~1161
- 5 Farnsworth W E. The role of the steroid-sensitive cation-dependent ATPase in human prostatic tissue. J Endocr, 1972, 54: 375~385
- 6 Lo A, Emmen J, Goos H J, et al. Direct positive effects of testosterone on GnRH-stimulated gonadotropin release from dispersed goldfish (*Carassius auratus*) pituitary cells. In: Geotz F W, Thomas P, eds. Proceeding of the fifth international symposium on the reproductive physiology of fish. Austin, USA: Symposium 95, 1995. 35
- 7 Weil C. Cultured pituitary cell GH response to GnRH at different stages of rainbow trout oogenesis and influences of steroid hormones. Gen Comp Endocrinol, 1990, 79: 483~491
- 8 Kobayashi M, Aida K, Hanyu I. Induction of gonadotropin surge by steroid hormone implantation in ovariectomized and sexually regressed female goldfish. Gen Comp Endocrinol, 1989, 73: 469~476

In vitro Studies of the Effect of 1 β -Estradiol on the Growth Hormone Secretion by the Pituitary of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.)

Li Wensheng* Lin Haoran

Abstract The effect of 1 β -Estradiol on the growth hormone secretion by the pituitary of common carp was studied by using in vitro perfusion system for pituitary fragments. The basal GH release rose significantly 30 min after the introduction of E₂ (1 μ mol/L) to the pituitary fragments of sexually mature common carp (GSI 15.6%~25.4%), and reached the highest value of (377.8 \pm 99.5) ng/mL after 2 h. Then it reduced to (188.6 \pm 65.2) ng/mL without significant difference to the value before the E₂ was introduced after 240 min of the E₂ treatment. In this study, overnight E₂ treatment did not alter the basal GH release. But it indicated that the effects of prolonged E₂ exposure on LHRH-stimulated and TRH-stimulated GH release in common carp can be exerted directly at the pituitary level. E₂ played an inhibition role in the LHRH-stimulated GH release but a promoting role in the TRH-stimulated one.

Keywords 1 β -Estradiol, growth hormone, thyrotropin-releasing hormone, analog of gonadotropin-releasing hormone, perfusion, common carp

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