

多巴胺能药物对虎纹蛙 GnRH 和 LH 分泌活动的影响*

李远友^① 林浩然^{②**}

(① 汕头大学科学中心 汕头 515063; ② 中山大学水生经济动物研究所 广州 510275)

摘要: 利用在体注射实验和放射免疫测定法, 研究了多巴胺能药物对性腺处于再发育期虎纹蛙的促性腺激素释放激素(GnRH)及促黄体激素(LH)分泌活动的影响。结果是:多巴胺(DA)及其激动剂阿扑吗啡(APO)可显著降低血浆 LH 水平; 而多巴胺的拮抗剂——地欧酮(DOM)可显著增加垂体 LH 含量。DA 对脑中 cGnRH-Ⅱ的合成有抑制作用, 而 DOM 对其 mGnRH 的释放有一定的刺激作用。结果表明:DA 可在脑及垂体水平分别抑制虎纹蛙 GnRH 和 LH 的释放, DA 对 LH 释放的抑制作用很可能是通过 D₂ 受体实现的。

关键词: 促性腺激素释放激素; 促黄体激素; 多巴胺能药物; 放射免疫测定法; 虎纹蛙
中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)06-13-04

Effects of Dopaminergic Drugs on the Secretion of Gonadotropin-releasing Hormone and Luteinizing Hormone in *Rana rugulosa*

LI Yuan-You^① LIN Hao-Ran^②

(① Science Center, Shantou University Shantou 515063; ② Zhongshan University Guangzhou 510275, China)

Abstract: The effects of dopaminergic drugs on the secretion of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) were investigated by the *in vivo* injection of dopamine (DA), apomorphine (APO) and domperidone (DOM) into *Rana rugulosa* at the sexually recrudescing stage, and by radioimmunoassay. It was found that both DA and APO markedly decreased plasma LH levels, while DOM significantly elevated pituitary LH content. DA inhibited the synthesis of brain cGnRH-Ⅱ, whereas DOM showed stimulatory effect on its mGnRH release. The results demonstrate that DA has inhibitory effects on the release of GnRH and LH at the brain and pituitary levels, respectively. The inhibition of DA on pituitary LH release probably acts through a D₂-receptor.

Key words: Gonadotropin-releasing hormone (GnRH); Luteinizing hormone (LH); Dopaminergic drugs; Radioimmunoassay (RIA); *Rana rugulosa*

在鱼类,大量的研究表明,多巴胺对促性腺激素(GtH)及促性腺激素释放激素(GnRH)的分泌有抑制作用^[1,2];在哺乳类,多巴胺对GnRH的释放表现出抑制或刺激的双重作用^[3]。在蛙类,除了 Sotowska-Brochocka 及其合作者报道过冬眠林蛙(*Rana temporaria*)中可能

存在有 GnRH 和促黄体激素(LH)释放的多巴

* 本文是第一作者在中山大学做博士论文研究工作的一部分;

** 通讯作者;

第一作者介绍 李远友,男,37岁,副研究员,博士;研究方向:水生动物生理学及内分泌学。

收稿日期:2002-02-05,修回日期:2002-04-12

胺能抑制作用外^[4-6],尚少见这方面研究的其它报道。那么, GnRH 和 GtH 释放的多巴胺能抑制作用在蛙类是否具有普遍性? 除冬眠蛙外, 非冬眠蛙中是否也存在多巴胺能抑制作用? 多巴胺能抑制作用的部位和机制如何? 这些都有待研究。为此, 本研究以处于非冬眠期的虎纹蛙 (*Rana rugulosa*) 成蛙为对象, 通过在体注射实验研究多巴胺能药物对 GnRH 和 LH 分泌的影响, 以期对多巴胺在蛙类的作用特点有更多的了解, 在理论上为蛙类生殖内分泌学充实新的内容, 在生产上为蛙类催产剂的研制及其人工繁殖提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 体质健壮的性腺处于再发育期的虎纹蛙雌蛙购于广州农贸市场, 暂养于室内水泥池中 1 周后用于实验。蛙体重为 51~68 g, 性腺成熟系数 (GSI) 为 $(1.34 \pm 0.41)\%$ ($n = 12$)。

1.2 实验设计及药品配制 实验分 4 组, 每组 12 只。即对照组 (注射蛙用生理盐水) 及多巴胺 (DA)、地欧酮 (DOM) 和阿扑吗啡 (APO) 注射组。DA、DOM、APO 均为 Sigma 公司产品。药品用分析天平称好后, 根据其溶解性质的不同, 先将它们用极少量的溶剂 (DA 用酸化的生理盐水, DOM 用生理盐水, APO 用二甲亚砜) 溶解, 再以蛙用生理盐水稀释到所需注射浓度 (2 mg/ml)。每只蛙注射两次, 分别于上午 9 时和中午 12 时进行。剂量为 20 $\mu\text{g/g}$ b. wt, 每次约 0.4 ml。注射部位为背淋巴囊。下午 3 时开始取样。

1.3 取样方法 血浆、垂体及脑样品的制备同作者以前报道过的方法^[7-9]。简言之, 将蛙用乙醚麻醉, 称体重后用 1 ml 经过抗凝处理的注射器从心脏取血。血液经离心后得血浆, 保存于 -20℃ 冰箱中待测 LH 含量。将取血后的蛙处死, 快速分离出垂体和整脑, 分别放入 1.5 ml 离心管中, 立即置液氮中速冻保存。每个垂体用 1 ml 约 4℃ 的 LH 测定缓冲液、在超声波下匀浆, 匀浆液直接用于 LH 含量的测定。

脑组织 GnRH 的抽提: 脑经称重后, 每个

脑用 1 ml 约 4℃ 的 2N 乙酸、在超声波下匀浆。匀浆液经离心后, 将上清液冷冻干燥。干品保存于 -20℃ 冰箱中。在进行 GnRH 测定前, 将此冻干品用 GnRH 测定缓冲液再溶解, 经离心后上清液用于 GnRH 含量的测定。

1.4 样品测定及数据分析 垂体及血浆样品 LH 含量的测定同作者报道过的方法, 即采用高度特异性的牛蛙 LH 放射免疫测定 (RIA) 法^[7, 10]。LH 标准品及其抗血清为日本早稻田大学的 Ishii 博士提供。LH 和促卵泡激素 (FSH) 的交叉反应 < 1%, 与其它垂体肽几乎没有交叉反应。

作者曾报道过, 虎纹蛙和其它大多数蛙种一样, 只存在哺乳类型 GnRH (mGnRH) 和鸡 II 型 GnRH (cGnRH-II)^[7, 9, 11]。脑组织样品 mGnRH 和 cGnRH-II 含量的测定同作者报道过的方法, 即特异性的 RIA 法^[7, 9]。mGnRH 标准品购自 Sigma 公司, cGnRH-II 标准品由香港大学 K. L. Yu 博士赠送; mGnRH 抗血清 (1076) 和 cGnRH-II 抗血清 (lot a cII6) 分别由南非 Cape Town 大学的 King 教授和日本国立水产研究所的 Okuzawa 博士友好提供。mGnRH 抗血清和 cGnRH-II 的交叉反应为 0.11%, 而 cGnRH-II 抗血清和 mGnRH 的交叉反应 < 0.01%。

数据以平均值 \pm 标准差表示。采用邓肯 (Duncan) 氏新复极差法检验各组间平均值的差异性。当 $P < 0.05$ 时, 认为差异显著; $P < 0.01$ 时, 差异极显著。

2 结 果

2.1 对虎纹蛙脑中 mGnRH 和 cGnRH-II 含量的影响 与对照组相比, 注射多巴胺能药物 (DA、DOM、APO) 对虎纹蛙脑中 mGnRH 的总含量无显著影响 (图 1: A), 但 DA 显著降低、而 APO 显著增加了脑中 cGnRH-II 的总含量 (图 1: C)。将脑中 GnRH 的总含量换算为每 mg 脑组织的含量后, 注射 DOM 组的 mGnRH 含量 (图 1: B) 及注射 DA 组的 cGnRH-II 含量 (图 1: D) 显著低于对照组, 而注射 APO 组的 cGnRH-II 含量与对照组无显著差异 (图 1: D)。

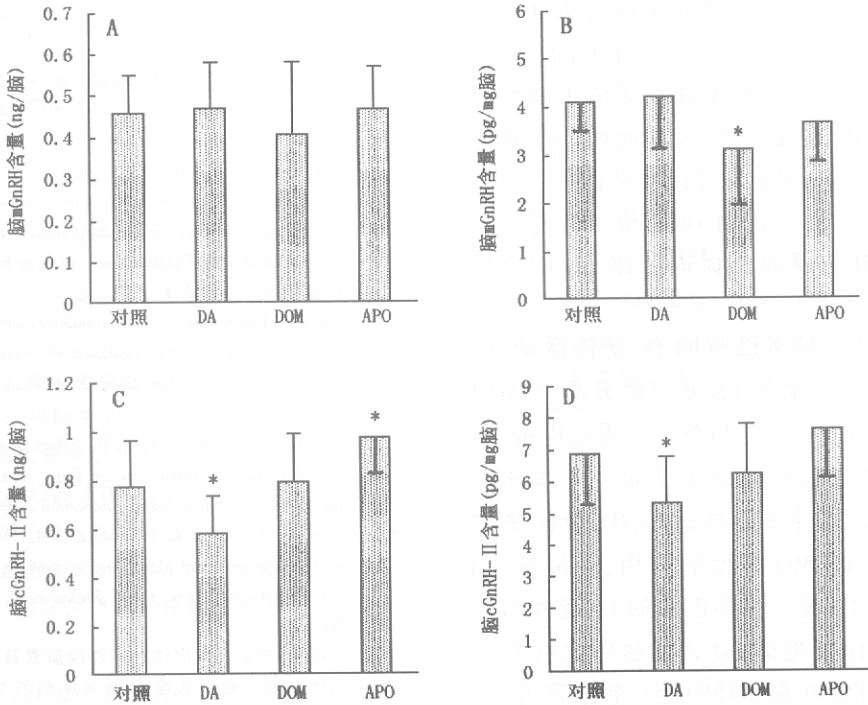


图1 注射多巴胺能药物对虎纹蛙雌蛙脑中 mGnRH 和 cGnRH- II 含量的影响

A, C: 总含量; B, D: 每毫克脑组织的含量

数据以平均值 ± 标准差表示 (n = 12), * 表示该组平均值与对照组差异显著 (P < 0.05)

2.2 对虎纹蛙垂体及血浆 LH 含量的影响
与对照组相比,注射 DA 及 DOM 分别显著和极显著地增加了垂体 LH 的含量(图 2: A)。DOM

对血浆 LH 水平有一定的升高作用,而 DA 及其激动剂 APO 都显著降低了血浆 LH 水平(图 2: B)。

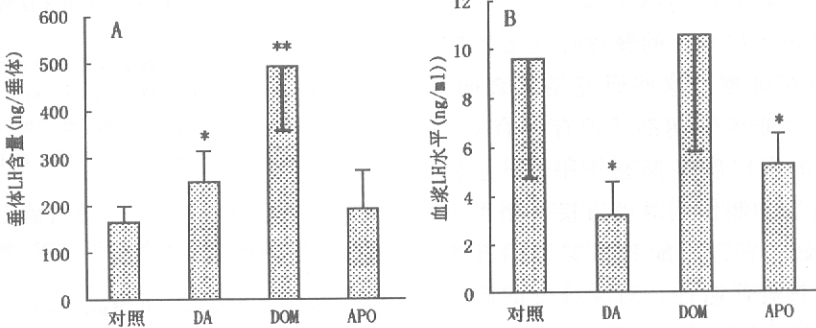


图2 注射多巴胺能药物对虎纹蛙雌蛙垂体和血浆 LH 含量的影响

数据以平均值 ± 标准差表示 (n = 12); * 和 ** 分别表示该组平均值与对照组差异显著 (P < 0.05) 和极显著

3 讨论

本研究中,注射外源性的 DA 及其激动剂 APO 都能显著降低性腺处于再发育期虎纹蛙的血浆 LH 水平(图 2: B);另一方面,注射 DA 增加了垂体 LH 含量(图 2: A)。说明在体条件

下,DA 可在垂体水平抑制 LH 的释放。这和作者的离体实验结果一致,即 DA 可显著抑制成熟前期和冬眠期虎纹蛙垂体 LH 和 FSH 的释放^[12]。DA 能显著降低脑中 cGnRH- II 的含量(图 1: C, D),可能是 DA 对脑中 cGnRH- II 的合成产生抑制作用的结果。这与作者的离体实验

结果类似,即 DA 对成熟前期虎纹蛙离体的视前-下丘脑-正中隆起片段的 cGnRH-II 的释放有显著的抑制作用^[13]。DOM 显著降低了脑组织 mGnRH 含量(图 1: B),极显著地增加了垂体 LH 含量(图 2: A),对血浆 LH 水平也有一定的升高作用(图 2: B)。说明 DOM 很可能通过刺激脑中 mGnRH 的释放而促进垂体 LH 的形成和释放。

BROMO 是一种多巴胺的 D₂ 受体激动剂,可抑制冬眠林蛙的血浆 LH 水平的升高^[4];MET 是一种多巴胺的 D₂ 受体拮抗剂,通过促进 LH 的产生而诱导冬眠林蛙提前排卵^[14]。本研究所用的 APO 是一种多巴胺的 D₁/D₂ 受体激动剂,表现出跟 BROMO 相似的作用,即抑制 LH 的释放。而 DOM 是一种多巴胺的 D₂ 受体拮抗剂,跟 MET 的作用类似,显著增加虎纹蛙垂体 LH 含量。从虎纹蛙和林蛙中的相似结果可知,DA 在垂体水平对 LH 释放的抑制作用很可能是通过 D₂ 受体实现的。这和在鱼类中的研究结果一致^[15,16]。

Sotowska-Brochocka 及其合作者通过一些间接的实验,在冬眠林蛙中发现有 GnRH 和 LH 释放的多巴胺能抑制作用^[4-6,14]。作者通过本研究的在体实验与其它离体实验^[12,13],在虎纹蛙中获得了 GnRH 和 GtH 的释放存在多巴胺能抑制作用的直接证据。这些研究结果表明,虎纹蛙在冬眠期和非冬眠期都可能存在有 GnRH 和 GtH 释放的多巴胺能抑制作用,只是程度不同而已。这种抑制作用既可直接作用于垂体,也可作用于脑。它很可能和鱼类及哺乳类一样,在蛙类也具有普遍性。对虎纹蛙的研究结果提示:在生产上可选用人工合成的 GnRH 或其类似物,以及合适的多巴胺受体拮抗剂(如 DOM),作为虎纹蛙(甚至其它蛙类)人工繁殖的催产剂之一。

参 考 文 献

[1] Peter R E, Tredeau V L, Sloley B D *et al.* Actions of catecholamines, peptides and sex steroids in regulation of gonadotropin-II in the goldfish. In: Scott A P, Sumpter J P, Kime

- D E, Rolfe M ed. Reproductive Physiology of Fish. Fish Symp 91, Sheffield, 1991. 30 ~ 34.
- [2] Yu K L, Peter R E. Adrenergic and dopaminergic regulation of gonadotropin-releasing hormone release from goldfish preoptic-anterior hypothalamus and pituitary *in vitro*. *Gen Comp Endocrinol*, 1992, **85**: 138 ~ 146.
- [3] Rasmussen D D. The interaction between mediobasohypothalamic dopaminergic and endorphinergic neuronal systems as a key regulator of reproduction: an hypothesis. *J Endocrinol Invest*, 1991, **14**: 323 ~ 352.
- [4] Sotowska-Brochocka J. The stimulatory and inhibitory role of the hypothalamus in the regulation of ovulation in grass frog, *Rana temporaria* L. *Gen Comp Endocrinol*, 1988, **70**: 83 ~ 90.
- [5] Sotowska-Brochocka J, Licht P. Effect of infundibular lesions on GnRH and LH release in the frog, *Rana temporaria*, during hibernation. *Gen Comp Endocrinol*, 1992, **85**: 43 ~ 54.
- [6] Sotowska-Brochocka J, Martynska L, Licht P. Changes of LH level in the pituitary gland and plasma in hibernating frogs, *Rana temporaria*. *Gen Comp Endocrinol*, 1992, **87**: 286 ~ 291.
- [7] 李远友,林浩然. 虎纹蛙促性腺激素及其释放激素含量的日变化. 汕头大学学报(自然科学版), 1999, **14** (1): 48 ~ 53.
- [8] Li Y Y, Lin H R. Changes of gonadotropin contents according to age and season in *Rana rugulosa* Wiegmann. *Dev Rep Biol*, 2000, **9** (2): 23 ~ 29.
- [9] Li Y Y, Lin H R. Differences in mGnRH and cGnRH-II contents in pituitaries and discrete brain areas of *Rana rugulosa* W. according to age and stage of maturity. *Comp Biochem Physiol*, Part C, 2000, **125**: 179 ~ 188.
- [10] 李远友,林浩然. GnRH 对虎纹蛙 LH 和 FSH 分泌活动的调节作用. 中山大学学报(自然科学版), 1998, **37** (5): 92 ~ 96.
- [11] 李远友,林浩然. 蛙类促性腺激素释放激素的研究. 动物学杂志, 1998, **33** (2): 52 ~ 54.
- [12] 李远友,林浩然. 多巴胺,雌二醇及睾酮对虎纹蛙垂体碎片促性腺激素释放的影响. 动物学研究, 2000, **21** (6): 441 ~ 445. (英文)
- [13] 李远友,林浩然. 虎纹蛙促性腺激素释放激素分泌调节的离体研究. 动物学报, 2002, **48** (2): 221 ~ 226. (英文)
- [14] Sotowska-Brochocka J, Martynska L, Licht P. Dopaminergic inhibition of gonadotropic release in hibernating frogs, *Rana temporaria*. *Gen Comp Endocrinol*, 1994, **93**: 192 ~ 196.
- [15] Peter R E, Chang J P, Nahorniak C S *et al.* Interactions of catecholamines and GnRH in regulation of gonadotropin secretion in teleost fish. *Recent Pro Horm Res*, 1986, **42**: 513 ~ 545.
- [16] Omeljaniuk R J, Shih S H, Peter R E. *In vitro* evaluation of dopamine receptor-mediated inhibition of gonadotropin secretion from the pituitary gland of the goldfish, *Carassius auratus*. *J Endocrinol*, 1987, **114**: 449 ~ 458.