

吳郭魚腦下垂體排卵素之測定及其週期變化*

Changes of the Pituitary Luteinizing Hormone (LH) Concentration in *Tilapia mossambica*施 河
Shih, Ho黃 基 礎
Ji-Chuu Hwang

摘 要

吳郭魚腦下垂體排卵素 (LH) 之濃度, 可以大白鼠 (Wistar strain) 做為測定動物, 應用卵巢維生素 C 消耗法 (OAAD) 施以生物定量 (Bio-assay)。正常吳郭魚腦下垂體排卵素具週期變化, 排卵前濃度 $2.60 \mu\text{g NIH-LH-B7/mg}$, 排卵後降為 $1.14 \mu\text{g NIH-LH-B7/mg}$, 約成 2 與 1 之比。文中並討論排卵與性腺刺激素 (gonadotropins) 等作用機序。

緒 言

魚類之成熟與生殖, 受各種內外因子及其因子間相互作用的影響 (Hoar, 1951; Miu, 1966)。然直接控制生殖最重要的該屬腦下垂體及其有關之性腺刺激素 (gonadotrophins)。許多魚類之繁殖, 進而已由人工法應用激素與藥物來處理 (Tang, 1964; Sundararaj et al 1966, 1969, 1972)。究其目的, 在於追求促進卵巢及卵成熟, 排卵以及產卵和受精能力的加強。影響動物之配子成熟與釋放的重要激素, 在哺乳類有 LH 和 FSH。至其含量, 因動物具動情週期 (estrous cycle) 或經期 (menstrual cycle) 而有規律的變化; 但在鳥類, 隨著排卵作用 LH 量也有週期的變化 (Ma, 1971)。至於魚類, 生殖乃又受光、溫度以及食物等因子影響, 遂有些甚至一年有多次的產卵, 其機序顯較他類動物為複雜。Ball 等人 (1960) 推知魚性腺刺激素不但作用於卵之次生長期 (2nd-growth phase) 也影響排卵作用。此外, 據 Lakshman (1959) 及 Ball (1960) 報告, 更說明如以腦

下垂體物質以及 HCG 等物質處理軟骨魚、硬骨魚或兩棲類以及鳥類以上之動物, 均能誘發排卵與排精作用, 但是該等處理的結果却發現有生物種類上的特異性 (Phylogenetic specificity)。

1972 年, Hyder 曾提出下述假說: 認為 *Tilapia* 可能產生兩種不同單位之性腺刺激素, 各負不同職責。本省吳郭魚 (*Tilapia mossambica*) 繁殖迅速年產卵多至八、九次以上 (松原喜代松、客合明, 1965), 推想其性腺刺激素, 定然隨著排卵前後發生各種變化。因此, 其排卵素是否有週期變化, 其與排卵作用之關係如何, 均值得探討。至於魚腦下垂體排卵素之測定, 方法繁多, 報告不一。本研究, 擬以 Parlow (1958) 提出之 OAAD 法, 略加修改應用, 以探究其可行性並測定其腦下垂體排卵素濃度之週期變化, 進而闡釋其與產卵作用之機序。

材料與方法

1 魚腦下垂體之收集與儲存:

選取個體重約 280 gm 之吳郭魚 (*Tilapia mossambica*) 將其定位後, 以利刀由頭背中線右側垂直下切, 細心摘取腦下垂體, 又剪開腹腔觀察卵與卵巢以判定其成熟度。取下之腦下垂體置入排卵前或排卵後兩類, 分別置丙酮液內冷存 (48 小時內更換丙酮液二次)。測定前 24 小時, 取出腦下垂體置室溫下使丙酮自然散失, 隨後存放乾燥器內備用 (Hwang et al., 1974)。測定時, 取 20 個腦下垂體於 5 ml 0.9% 食鹽液中共研, 最後稀釋成欲測定之濃度。

2 魚排卵素測定法:

應用略事修改之 Parlow (1958) 卵巢維生素 C 消耗法 (Ovarian Ascorbic Acid Depletion;

* 本文承國家科學會補助

OAAD)法,以測定腦下垂體排卵素之濃度。此乃應用排卵素具有消滅卵巢內維生素C含量之原理。茲將步驟略述如下:

選出生後 23—24 天之未成熟大白鼠 (Wistar strain), 由皮下注射 50IU 之孕馬血清 (Pregnant Mare's Serum; PMS; Gestyl, Organon, Holland)。隔 72 小時後, 再注射同劑量之 PMS。於第二次注射 PMS 後 72 小時, 由皮下另注射 50 IU 之 HCG (Human Chorionic Gonadotrophin; Pregnyl, Organon, Holland)。經六日後 (Sakiz and Guillemin, 1963), 由每隻測定動物 (assay animal) 之尾靜脈注入 0.5 ml 之排卵素標準液 (NIH-LH-B7; 由美國 National Institute of Health—NIH 贈與) 或按下列生物測定 (Bioassay) 過程之濃度注入魚腦下垂體萃取液 (試驗材料)。俟注射後 4 小時, 由鼠背方取出兩側卵巢, 去夾膜及脂肪組織稱其每一卵巢之濕重後 (準確至 0.1 mg), 按 Mindlin 與 Butler (1938) 法, 測定每一卵巢中維生素 C 之含量, 記錄並加以比較。

3. 生物測定 (Bioassay):

每次測定, 須同時作一 LH 標準曲線。本實驗所用為 NIH-LH-B7, 分為二種劑量 (dose): 低劑量, 每隻測定動物注射 0.4 μ g/0.5ml 生理鹽水; 高劑量, 1.6 μ g/0.5ml 生理鹽水 (Sch-

wartz and Bartosik, 1962)。魚腦下垂體試驗材料乃採取相當於 $\frac{1}{2}$ 及 2 個腦下垂體 (本實驗室)。測定動物則隨機分組。用以製就 LH 標準曲線之每一劑量用鼠至少各為六隻, 備以測定魚腦下垂體萃取液者, 至少五隻。所測結果, 以劑量對數值 (log dose) 為橫座標, 維生素 C 含量為縱座標, 求出劑量反應 (dose-response) 之迴歸係數。以統計方法證明各迴歸係數確無顯著差異 (Bliss, 1952) 後, 才合併計算以求出魚腦下垂體中排卵素對應於 NIH-LH-B7 之相對效應量 (relative potency) 及 λ (lamda) 值。並將重複試驗所得之相對效應量加權之 (Burn 等, 1952)。

結 果

吳郭魚腦下垂體對測定動物卵巢維生素 C 含量之影響列於表一, 經變方分析結果, 排卵前其影響顯著 ($P < 0.05$), 迴歸係數在統計上有意義 (表二) ($P < 0.05$), 然排卵後之影響 (表一) 及所得之迴歸係數 (表二) 則否 ($P > 0.05$)。

正常吳郭魚之腦下垂體排卵素, 排卵前相對於 NIH-LH-B7 之量 (濃度) 為每 mg 乾重含 2.60 μ g, 排卵後測不出其活性 (其量降為 1.14 μ g/mg, 迴歸係數 $P > 0.05$)。

討 論

Table 1 Effect of fish pituitaries on the ascorbic acid content of rat ovaries with OAAD assay method

		OAA content (μ g/100 mg of ovarian wt)	
		Mean \pm S. E.	
		Assay 1	Assay 2
Standard LH**	seline	74.56 \pm 4.59(6)*	69.49 \pm 9.86(5)
	0.4 ug LH	66.05 \pm 3.36(7)	55.18 \pm 3.28(6)
	0.6 ug LH	50.38 \pm 3.05(7)	44.66 \pm 2.85(6)
Post-ovulation	$\frac{1}{2}$ pituitary	72.13 \pm 6.86(6)	61.37 \pm 3.13(5)
	2 pituitary	61.76 \pm 4.54(6)	51.25 \pm 6.33(5)
Pre-ovulation**	$\frac{1}{2}$ pituitary	67.25 \pm 3.82(5)	55.10 \pm 6.82(5)
	2 pituitary	62.44 \pm 6.05(5)	46.83 \pm 5.30(5)

* No. of assay animal per dose

** Significance tested by ANOVA, $P < 0.05$

Table 2 Fish pituitary LH concentration

Groups	LH Potency* ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of pituitary dry weight)	Lamda (s/b)	95 % confidence limit	slope
Pre-ovulation	2.62	0.39	1.15-5.98	-23.50***
	2.58 (2.60)**	0.46	0.83-7.94 (1.33-5.15)	-17.01***
Post-ovulation	1.19	0.57	0.29-4.89	-17.22
	1.10 (1.14)**	0.39	0.31-3.94 (0.44-2.94)	-16.36

* Relative potency in terms of NIH-LH-B7 (1.16 U/mg)

** Weighted mean

*** Significance tested by Student's t-test, $P < 0.05$

本研究以 OAAD 法測定吳郭魚 (*Tilapia mossambica*) 腦下垂體排卵素之濃度，發現排卵前其排卵素之濃度為 $2.60 \mu\text{g LH-B7}/\text{mg}$ ，排卵後為 $1.14 \mu\text{g LH-B7}/\text{mg}$ 。吳郭魚腦下垂體分二劑量注入已備妥之測定動物，均能使卵巢維生素 C 減少(表一)且有劑量反應關係，其迴歸係數與標準排卵素曲線相較，並無顯著差異 ($P > 0.05$)，顯然致維生素 C 減少之因素為這種魚腦下垂體中之排卵素，至少是類似哺乳類 LH 物質。

使用 OAAD 法之測定動物為鼠，自 Parlow (1958) 提出後，贊究者頗多 (Sakiz and Guillemin, 1963; Bell 等, 1965; Koed and Hamburger, 1967)，因其對 LH 具高度專一性 (Specificity) 與靈敏性 (Schmidt-Elmendorf and Loraine, 1962)，且為生物體內之真正反應，是而廣被採用。美國 NIH 贈予世界各地做為標準用純激素，至今仍採用此法以標定其效應量 (potency)，而為今日國際公認之單位。此法應用於哺乳類及鳥類之報告甚多 (Schwartz and Bartosik, 1962; Jackson and Nalbandov, 1969; 萬與黃, 1973; 馬, 1971)。至於用之於魚腦下垂體排卵素之測定尚鮮見報告，此或因種系相異，所得結果不一。測定魚腦下垂體排卵素之報告諸多不一，應用方法繁多。如 Vy'un Unit (Kazarskii, 1949); Brazilian Fish Unit (Fontonele, 1955); Weaver finch assay (Witschi, 1955)

; Goldfish testicular hydration assay (Clemens and Grant, 1964) 和 (Chick testicular radiophosphate uptake assay (Florsheim et al, 1959) 以及排精反應 (Yamazaki 與 Donaldson, 1968) 等等均是。1956 年，Otsuka 曾以未成熟小白鼠研究鮭魚 (*Oncorhynchus*) 之腦下垂體。Fontaine 與 Chauvel (1961) 則採用 Steelman 與 Pohley (1953) 法，測得肺魚 (*Protopterus*) 腦下垂體萃取液中之 FSH 相當於 $75.9 \mu\text{g NIH-FSH-S3}/\text{mg}$ ，又以 OAAD 測得 LH 之效應小於 $1.4 \mu\text{g NIH-LH-B5}/\text{mg}$ ，聲稱其為測不出 LH 活性 (1973, Donaldson 所引證)。然此乃利用哺乳類探測魚腦下垂體性腺刺激素之嘗試。本研究以 OAAD 法探討其定量魚腦下垂體之可行性，已獲及上述結果，藉此推廣，或可使魚排卵素獲得一公認之單位，進而比較異種及不同魚齡間之差異，當裨益淡水魚之繁殖與養殖。唯所得結果 λ (lamda) 自 0.39 至 0.57，自認有待更進一步探究，若將排卵素萃取並純化以施行，問題或將解決。

本實驗發現吳郭魚於排卵前，其腦下垂體排卵素之濃度高於排卵後，此當與其排卵機序有關。實驗中，排卵前後之判定係根據卵巢及卵之成熟與否為準。排卵前之排卵素濃度較高，示 LH 負排卵之責外尚與卵之成熟有關。Hoar (1965) 認為魚腦下垂體性腺刺激素以 LH 為主，其生理與生化性質且

極似哺乳類之 LH。Ramaswami (1962) 則相信魚(鯰)腦下垂體僅含類排卵素因子(LH-like factor); Sundararaj 與 Goswami (1969) 實驗證明 LH 與 DOC 對鯰魚具有強排卵作用: 彼等分別以蛋白酶(pepsin)及澱粉酶(ptyalin)處理鯰魚(*Heteropneustes fossilis*)之腦下垂體, 則僅後一情況之腦下垂體才能誘發此種魚排卵(前者破壞 LH, 後者破壞 FSH)。此外, 彼等尚證明 LH 可促使『去腦下垂體鯰魚』排卵(1966, 1972)。凡此, 皆說明 LH 對魚排卵重要性之一般。如此, 則排卵前內源性 LH 之增多勢所必然。本研究發現排卵後之 LH 濃度為 1.14 μg NIH-LH-B7/mg, 此是否確如 Donaldson 之引證值得商榷, 作者以為此乃因排卵素自腦下垂體釋出, 以致效量降低, 是以雖能致測定動物卵巢維生 C 消滅, 却無顯著差異(表一), 故斜率亦不存在 ($P > 0.05$), 如是, 則吳郭魚腦下垂體排卵素必有排卵前濃度高, 而排卵後降低之週期變化。Breton 等(1972) 曾發現金魚血漿中性腺刺激素有日變化, 七月間不排卵之雌金魚, 血漿中性腺刺激素濃度, 自 8 AM 經 11 AM 至午夜分別為每 ml 5.75 ng、9.55 ng、3.34 ng; 而排卵日高出排卵前甚多, 其血中之量可高達 49.3 ng/ml (1972)。本試驗所得排卵後之吳郭魚其腦下垂體排卵素濃度減少, 可能亦為釋出所致, 唯本實驗未曾測定血中排卵素濃度之變化。這種想法, 如同 Donaldson (1973) 測得野生鱈紅鮭(*Oncorhynchus gorbuscha*) 其血中性腺刺激素濃度於排卵後產卵前高達 74.9 ng/ml, 也暗示由腦下垂體釋出之可能性甚大。Barr 與 Hobson (1964)、Swift 與 Pickford (1965)、Clemens 與 Johnston (1965) 以及 Singh (1970) 曾先後報告當魚成熟時, 腦下垂體性腺刺激素增加, 產卵(spawning)後則減少。有關週期變化的原因, 目前尚乏有力證據, 光與溫度等外在的生態因子不無可能(Hoar, 1965; Donaldson, 1973)。

誌 謝

本實驗承恩師繆端生教授鼓勵。由衷感激! 彰化呂清海養殖場提供各期實驗用魚; 實驗進行中, 陳懿慧助教及賴鴛鴦同學的協助, 併誌於此致謝忱。

參考文獻

1. Ball, J. N.
Reproduction in female bony fishes, Symp. Zool. Soc. London, 1:105-135, 1960.
2. Barr, W. A., and B. M. Hobson
Endocrine control of the sexual cycle in the plaice, *Pleuronectes platessa* L., IV Gonadotropic activity of the pituitary gland. Gen. Comp. Endocrinol. 4:608-613 1964.
3. Bliss, C. I.
The Statistics of Bioassay, Academic Press Inc., N. Y. pp. 492-586, 1952.
4. Breton, B., G. Kann, E. Eurzawa-Gerard, and R. Billard
Dosage radioimmunologique d'une hormone gonadotrope de carpe. C. R. Hebd. seances Acad. Sci. 272:1515-1517, 1971.
5. Breton, B., R. Billard, B. Jalabert, and G. Kann
Dosage radioimmunologique des gonadotropines plasmatiques chez *Carassius auratus*, au cours du nycthemere et pendant l'ovulation. Gen. Comp. Endocrinol. 18:463-468, 1972.
6. Burn, J. H., D. F. Finney, and L. G. Goodwin
Biological standardization, 2nd ed., Oxford University Press, London, pp. 26-176, 1952.
7. Clemens, H. P., and F. B. Grant
The seminal thinning response of carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*) after injections of pituitary extract. Copeia, 2:174-177, 1965.
8. Clemens, H. P., and W. W. Johnston
Specificity of the gonadal hydration factor in the pituitary of some fresh water fishes. Copeia, 3:389-398, 1965.

9. Donaldson, E. M.
Reproductive endocrinology of fishes.
Amer. Zool. 13:909-927, 1973.
10. Fontaine, M., and M. Chauvel
Evaluation du pouvoir gonadotrope de l'hypophyse des poissons Teleosteens, et en particulier du *Salmo salar* L. a diverses etapes de son developpement et des migrations. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 257:822-825, 1961.
11. Fontenele, O.
Injecting pituitary (hypophysial) hormones into fish to induce spawning. *Progr. Fish Cult.* 17:71-75, 1955.
12. Jackson, G. L., and A. V. Nalbandov
Ovarian ascorbic acid depleting factors in the chicken hypothalamus. *Endocrinol.* 85: 113-120, 1969.
13. Hoar, W. S.
Comparative physiology: Hormones and reproduction in fishes. *Ann. Rev. Physiol.* 27:51-70, 1965.
14. Hoar, W. S.
Hormones in fish. *Univ. Toronto Biol. Seri.* 59:1-51, 1951.
15. Hoar, W. S.
Fish physiology, 3:1-72, Academic Press, N. Y. 1969.
16. Hwang, J. C., P. H. Li., and W. C. M. Wan.
Effect of induced hypothyroidism on pituitary luteinizing hormone concentration in female rats. *J. Formosan Med. Assoc.* 73: 227-231, 1974.
17. Ma. R. C. S.
Changes of the pituitary LH level in the ovulatory cycle of domestic ducks. *Journal of the Agricultural Association of China, New Series No.* 76, 1971.
18. Mindlin, R. L., and A. M. Butler
The determination of ascorbic acid in plasma. *J. Biol. Chem.* 122:673-686, 1938
19. Miu, T. S.
Ecological studies on the pisciculture in Taiwan. *Bull. Taiwan Normal Univ.* 11: 175-194, 1966.
20. Otsuka, S.
On the extraction and bioassay of the follicle stimulating and lutenizing substances of the salmon. *Endocrinol. Jap.* 3: 272-277, 1956.
21. Parlow, A. F.
A rapid bioassay method for LH and factors stimulating LH secretion. *Fed. Proc.* 17:402, 1958.
22. Ramaswami, L. S.
Endocrinology of reproduction in fish and frog. *Gen. Comp. Endocrinol. Suppl.* 11: 286-299, 1962.
23. Reinboth, R.
Hormonal control of the teleost ovary. *Amer. Zoologist*, 12:307-324, 1972.
24. Sakiz, E., and R. Guillemin
On the method of ovarian ascorbic acid depletion as a test for lutenizing hormone. *Endocrinol.* 72:804-812, 1963.
25. Schmidt-Elmendorft, H., and J. A. Lorraine
Some observation on the OAAD as a test for luteinizing hormone activity. *J. Endocrinol.* 23:413-421, 1962.
26. Schwartz, N. R. and D. Bartosik
Changes in pituitary LH content during the rat estrous cycle. *Endocrinol.* 77:756-762, 1962.
27. Singh, T. P.
Seasonal variations in cyanophils and gonadotropic potency of pituitary in relation to gonadal activity in catfish. *Endokrinologie*, 56:292-303, 1970.
28. Singh, T. P.
Role of interrenal in luteinizing hormone

- induced ovulation and spawning in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Block) Gen. Comp. Endocrinol. 2:374-384, 1969.
29. Sundararaj, B. I. and S. V. Goswami
Role of interrenal in luteinizing hormone induced ovulation and spawning in the catfish, *Heteropneustes fossilis* Gen. Comp. Endocrinol. Suppl. 2:374-384, 1969.
30. Sundararaj, B. I., and S. V. Goswami
Effects of mammalian hypophyseal hormones, placental gonadotrophins, gonadal hormones, and adrenal corticosteroids on ovulation and spawning in hypophysectomized catfish, *Heteropneustes fossilis*. J. Exp. Zool. 161: 287-296, 1966.
31. Sundararaj, B. I., T. C. Anand, and E. M. Donaldson
Effects of partially purified salmon pituitary gonadotrophin on ovarian maintenance, ovulation and vitellogenesis in hypophysectomized catfish, *Heteropneustes fossilis* Gen. Comp. Endocrinol. 18:102-114, 1972.
32. Swift, D. R. and G. E. Pickford
Seasonal variations in the hormone content of the pituitary gland of the perch *Perca fluviatilis* L. Gen. Comp. Endocrinol. 5: 354-365, 1965.
33. Tang, Y. A.
Induced spawning of striped mullet by hormone injection. Japanese J. of Ichthyology. 12: nos 1/2 23-28, 1964.
34. Wan, W. C. M. and J. C. Hwang
Effect of thyroidectomy on pituitary luteinizing hormone (LH) concentration in female rats. Bull. Inst. Zool. Academia Sinica 12(1):39-44, 1973.
35. Yamasaki, F. and E. M. Donaldson
The spermiation of goldfish as a bioassay for salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) gonadotrophin. Gen. Comp. Endocrinol. 10:383-391, 1968.
36. 松原喜代松 落合明
魚類等(下) 恒星社, 東京 pp. 881-884, 1965.

Changes of the Pituitary Luteinizing Hormone (LH) Concentration in *Tilapia mossambica*

Shih, Ho

Changes in level of the pituitary luteinizing hormone (LH) of mouth breeder, *Tilapia mossambica*, were measured by ovarian ascorbic acid depletion method (OAAD). From the above mentioned animal assay, the

Ji-Chuu Hwang

normal pituitary LH concentration in *Tilapia mossambica* is 2.60 μg NIH-LH-B7/mg pre-ovulation and declines to 1.14 μg NIH-LH-B7/mg post-ovulation. Possible mechanisms of fish ovulation are discussed.