

# 魚類腦下垂體促性腺激素之純化、生化 特性、生理功能及生物活性測定

余 玉 林·周 潔 華

中央研究院動物研究所內分泌學實驗室

## 摘 要

本文介紹魚類腦下垂體促性腺激素之純化，構造及生物活性及功能。涵蓋內容，部分是文獻資料，部分是筆者實驗室近年來之研究。

魚類之促性腺激素可能是單一類型，具有哺乳類之促黃體激素及促濾泡激素之功能。但近年來，發現魚類者亦有兩型，一為促性腺成熟激素，另一促卵黃生成激素。但並不相等於哺乳類之兩型促性腺激素；雖然如此，都具有次單元，以及其組成亦有某種程度之類似。

促性腺激素控制雌雄兩性之性腺發育，成熟及類固醇激素生成等生理功能。利用此特性，發展了許多活體或離體之方法，用以定性或定量其純度或生物活性。本文介紹約十種不同之活體及離體生物測定法，以檢定促性腺激素之活性。主要是利用魚類精巢及卵巢類固醇激素生成，排精及排卵能力，卵子成熟，性腺環苷酸生成，亦可使用其他脊椎動物作為檢定。特別介紹筆者實驗室所建立之鯉魚及鰱魚精巢雄性素生成系統，作為甚多種魚類促性腺激素之活性測定與研究。

在純化激素方面，簡介了筆者實驗室，從事鯉魚及鰱魚促性腺激素之分離及生物活性檢定之研究，製備鰱魚之促性腺激素抗體可供測定有關魚類血中，該激素之濃度與變化，追蹤其分泌型態及生理作用。

## 內 容

一、前言	2
二、腦下垂體分葉，細胞及激素之種類	3
三、部分及高度純化魚類促性腺激素之種別	4
四、魚類促性腺激素之構造與生化特性	6
A. 類型	6
B. 分子構造，次單元及生化特性	6
五、促性腺激素之分離與純化方法及抗體血清製備	8

A. 一般純化與分離方法.....	8
B. 鯉魚及鱧魚促性腺激素之純化與抗體製備.....	10
六、促性腺激素之生理功能.....	12
七、生物活性測定.....	15
A. 活體生物活性測定.....	16
1. 魚類排精法.....	16
2. 小雞精巢放射性磷吸收法.....	16
3. 鱧魚產卵器延伸.....	16
B. 離體生物活性測定.....	19
1. 離體卵巢或精巢環腺苷酸產生測定法.....	19
2. 離體卵巢雌二醇生成.....	19
3. 鯉魚精巢離體培養類固醇生成.....	22
4. 離體雞精巢組織雄性素生成.....	26
5. 離體魚卵成熟法.....	27
6. 離體鱧魚卵巢非脂化膽固醇消竭法.....	28
八、結論.....	29
九、誌謝.....	30
十、引用文獻.....	30

## 一、前    言

魚類腦下垂體促性腺細胞生成與分泌促性腺激素，控制性腺（精巢與卵巢）之發育，生長及生理功能。舉凡精子與卵子生成，排精與排卵作用，雄性素，雌性素類固醇激素生成，都由促性腺激素控制；因此其在生殖上扮演重要角色。為了解促性腺激素之構造與特性，首先必須獲得高純度之激素。迄目前為止，已有十餘種別魚類之促性腺激素被純化及研究，其構造與生化特性漸漸清楚。一般所使用之方法與步驟，多以先被研究認識較多之哺乳類模式為基準。

在純化分離過程中，必須事先具備簡便且高敏感度之方法，以追蹤或檢定其生物活性強弱。利用促性腺激素之生理功能，而發展建立活體及離體測定方法。尤其是離體生物活性測定法，在基礎研究，探討生理或分子作用上，貢獻至鉅；這些方法，亦可用作製備激素產品之生物活性檢定。因此生物活性測定法之建立與使用，在生殖內分泌之基礎研究及人工繁殖應用，都佔有重要地位。

本文簡介魚類腦下垂體促性腺激素之構造，純化/分離步驟，各種生物活性測定之原理及方法。所涵蓋內容，部分是文獻整理，部分是筆者實驗室近年來有關此專題之研究工作。有關於促性腺激素研究之進展，其文獻已先後被彙整，以供參閱 (Hoar, 1969; Lam *et al.*, 1978; Fontaine and Burzawa, 1978; Idler and Ng, 1983; 余玉林 1986)。魚類為脊椎動物之一，與兩棲類、爬行類及鳥類同為卵生脊椎動物。因此，在生殖內分泌系統上，有甚多類似之處。探討魚類促性腺激素，可說是比較內分泌之一環，除了解魚類生殖內分泌以外，在脊椎動物種緣演化之比較亦有貢獻。因此本文在適當之處，

儘量把其他脊椎動物包括哺乳類有關資料一起比較與討論，以便了解在魚類基礎研究與生殖應用上，爲何常使用其他不同種類之動物之激素，及作爲測試動物。

## 二、腦下垂體分葉，細胞及激素之種類

脊椎動物（圓口類、軟骨魚、硬骨魚、兩棲類、爬行類、鳥類及哺乳類）都有明顯且形狀與功能獨立腦下垂體或稱腦垂腺（hypophysis, pituitary body, pituitary gland, pituitary）。一般而言，腦下垂體，由神經腦下垂體（neurohypophysis）及腺體腦下垂體（adenohypophysis）組成（圖一）。魚類之腦下垂體，由發生學起源觀點來看，神經葉由腦部神經組織「向下延伸」而組成，而腺體葉則由外胚層原口（ectodermal stomodaeum）之板塊（plate）「向上延伸」演化而來。因此，神經腦下垂體與腺體腦下垂體之細胞構造差異甚大。

魚類雖有 2 萬多種，但是只有少部分種別之腦下垂體已被研究；魚類腦下垂體之形狀，大小及構造上，發現有甚大之差異。其腺體腦下垂體分爲三部分（葉），即中葉（pars intermedia），嘴狀遠側葉（rostral pars distalis）及近端遠側葉（proximal pars distalis），從組織學與電子學之研究指出，腺體腦下垂體有 7 種形狀與功能不同的細胞

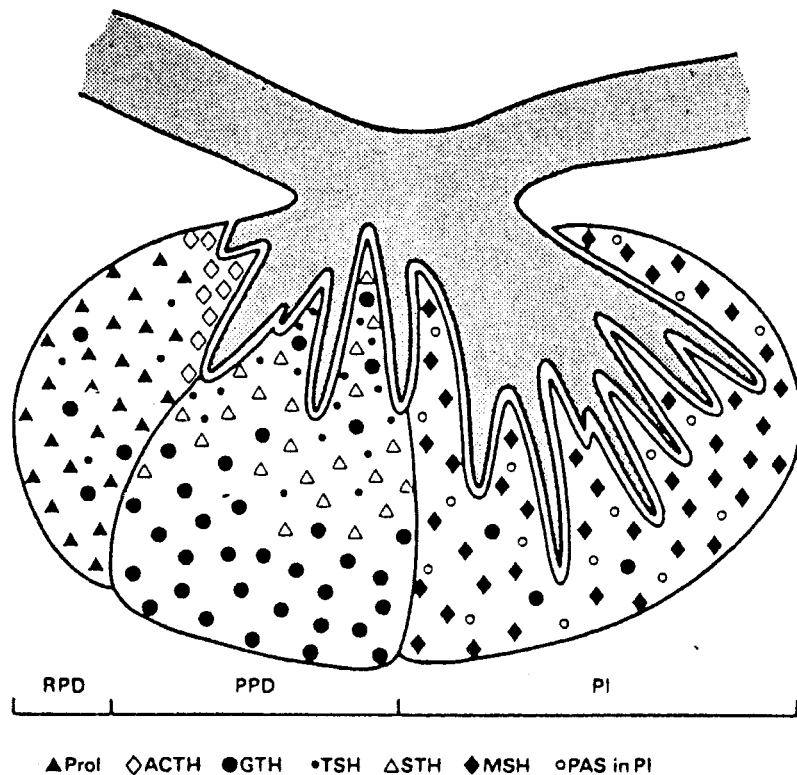


Fig. 1. Schematic representation of a sagittal section of a teleost pituitary showing the distribution of the functional cell types in the adenohypophysis (ACTH, corticotropic cell; GTH, gonadotropic cell; MSH, melanotropic cell; PAS in PI, periodic acids Schiff-positive cell in pars intermedia; PPD, proximal pars distalis; Prol, prolactin producing cell; RPD, rostral pars distalis; STH, somatotrophic cell; TSH, thyrotrophic cell; stippled area, neurohypophysis). (From Van Oordt and Peute, 1983)

(圖一)；其命名係根據分泌之激素種類而定，例如促性腺激素分泌細胞生成與分泌促性腺激素（或稱促性腺素、性腺促素、激性腺素、促性素等）(gonadotropin, 美式；gonadotrophin 英式，簡稱 GTH)，腎上腺皮質激素分泌細胞、泌乳激素分泌細胞（根據哺乳類功能命名），生長激素分泌細胞，促甲狀腺激素分泌細胞，促黑激素分泌細胞等。一般說來，一種細胞分泌一種激素，但皮質激素細胞分泌數種同源激素，如 corticotropin, endorphins 等。有關腺體腦下垂體各種細胞，部位以及分泌之激素（或稱內分泌素）(hormone)，列於表一。

表一 魚類腺體腦下垂體部位，細胞及激素種類

Table 1. Hormones, cell types and anatomical parts of adenohypophysis of a typical teleost

細胞	部位	分泌之內分泌素
促性腺激素分泌細胞 Gonadotrope, Gonadotroph	近端遠側葉為主 Proximal pars distalis	促性腺激素 Gonadotropin
促腎上腺皮質分泌細胞 Corticotrope, Corticotroph	嘴狀遠側葉 Rostral pars distalis	促腎皮質激素 Corticotropin (ACTH) 腦啡素 Endorphin
泌乳激素分泌細胞 Lactotrope, Lactotroph	嘴狀遠側葉 Rostral pars distalis	泌乳激素 Prolactin
生長激素分泌細胞 Somatotrope, Somatotroph	近端遠側葉 Proximal pars distalis	生長激素 Somatotropin 或 Growth hormone
促甲狀腺素分泌細胞 Thyrotrope, Thyrotroph	近端遠側葉 Proximal pars distalis	促甲狀腺素 Thyrotropin
促黑素分泌細胞 Melanotrope, Melanotroph	中葉 Pars intermedia	促黑素 Melanotropin (Melanocyte stimulating hormone, MSH)

神經腦下垂體由下視丘 (hypothalamus) 之神經元 (neuron) 及神經纖維 (nerve fibers) 延伸下來而組成，分泌血管收縮素 (昇壓素) 等蛋白質激素 (peptide hormone)，如 arginine, vasotocin, isotocin, oxytocin, valitocin, aspartocin 等。

### 三、部分及高度純化魚類促性腺激素之種別

魚類腦下垂體促性腺激素之分離與純化，始自 1960 年代。至今，有十餘種別已被部分或高度純化（表二）。每個實驗室所純化之促性腺激素，其純度 (purity) 及生物活性 (biological activity) 均有差異。此方面之研究人員主要在法國、加拿大、我國、日本、荷蘭及美國。國內中央研究院生化所（羅銅壁院士及黃火煉博士實驗室）及動物所（筆者實驗室）分別純化魚類之促性腺激素及有關研究。

表二 魚類腦下垂體促性腺激素，部份或高度純化之種別一覽表  
 Table 2. A summary of species of the partially and highly purified  
 piscine gonadotropins

中文名	英文名	學名	文獻
鯉科 (Cyprinidae)			
鯉魚	Common carp	<i>Cyprinus carpio</i>	Clemen <i>et al.</i> , 1964 Sinha, 1971; Sundararaj and Samy, 1974 Burzawa-Gerard, 1971, 1974 Idler and Ng, 1979 Huang <i>et al.</i> , 1981 Yu and Lin, 1986
金魚	Golden Fish	<i>Carassius auratus</i>	Haider and Blum, 1977
鱧魚	Silver Carp	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Kobayashi <i>et al.</i> , 1985 Yu and Lin, 1986
印度鯉魚	Catla	<i>Catla catla</i> ( <i>Hamilton buchanam</i> )	Banerjee, 1987
泥鯉	Mudfish	<i>Labeo umbratus</i> Smith	Hattingh and Dutoit, 1973
鮭科 (Salmonidae)			
王鮭	Chinook salmon	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Otsuka, 1956 Grönlund, 1969 Donaldson, <i>et al.</i> , 1972 Pircee <i>et al.</i> , 1976 Ng and Idler, 1978 Breton, 1981
白鮭	Chum salmon	<i>Oncorhynchus keta</i>	Yoneda and Yamazaki, 1976 Idler <i>et al.</i> , 1975
虹鱒	Rainbow trout	<i>Salmo gairdneri</i>	Breton <i>et al.</i> , 1976
左鰈科 (Bothidae)			
美洲比目魚	American plaice	<i>Hippoglossoides platessoides</i>	Campbell and Idler, 1977 Ng and Idler, 1979
冬季比目魚	Winter flounder	<i>Pseudopleuronectes americanas</i>	Ng and Idler, 1979
鱘科 (Acipenseridae)			
鱘魚	Starred sturgeon	<i>Acipenser stellatus</i>	Burzawa-Gerard <i>et al.</i> , 1975

表二 (續)

中文名	英文名	學名	文獻
鱧科 (Channidae)			
鱧魚	Murrel	<i>Channa punctatus</i> (Bloch)	Banerjee, 1987
慈鯛科 (Cichlidae)			
莫三鼻給 吳郭魚		<i>Tilapia mossambica</i>	Farmer and Popkoff, 1977 Hyder <i>et al.</i> , 1979
海鰻科 (Muraenesocidae)			
灰海鰻	Pike eel	<i>Muraenesox cinereus</i>	Huang <i>et al.</i> , 1981
塘虱魚科 (Clariidae)			
非洲塘虱魚	African catfish	<i>Clarias gariepinus</i>	Goos <i>et al.</i> , 1986

#### 四、魚類促性腺激素之構造與生化特性

##### A. 類型

脊椎動物腦下垂體促性腺激素 (GTH)，除魚類以外，均可分為兩型；一為促黃體激素 (luteinizing hormone, LH)，另一為促濾泡激素 (follicle stimulating hormone, FSH)。但是在魚類不能分開為 LH 及 FSH；因此一般稱為促性腺激素。魚類促性腺激素之生理功能：在雄性為(1)精子生成作用，(2)精巢雄性素生成，及(3)排精作用。而在雌性則為(1)卵子生成及卵泡成熟，(2)雌性素生成，及(3)排卵作用。換句話說，兼有 LH 及 FSH 兩種激素之作用。但是，加拿大 Idler 博士實驗室 (Idler *et al.*, 1975c; Ng and Idler, 1978) 報告分離出兩類型之魚類促性腺激素：一為卵黃生成促性腺激素 (vitellogenic gonadotropin, VGTH) 另一為卵泡成熟促性腺激素 (maturational gonadotropin, MGTH) 此二類型促性腺激素，在色譜分析柱之表現，氨基酸組成，免疫特性及生物特性上都有顯著差異。VGTH 所含碳水化合物較低於 MGTH, MGTH 即等於傳統上一般稱為之 GTH，而 VGTH 即是新近分離之另一種促性腺激素；MGTH 能促進卵巢雌性素 (estrogen) 之生成，再由此類固醇激素促進肝臟生成卵黃前質 (vitellogenin)，VGTH 能促進卵黃前質在卵巢之吸收及形成卵黃 (egg yolk)，在雄魚却不能。MGTH 能促進精巢雄性素生成，以及精子生成作用。Idler 氏實驗室報告鮭魚 (Salmon)，比目魚類 (plaice 及 flounder) 及鯉魚 (Carp) 都有此兩類型 GTH。

##### B. 分子構造，次單元及生化特性

魚類促性腺激素與其他高等脊椎動物之促性腺激素一樣，為醣類蛋白質激素 (glycoprotein hormone)，其分子量為 30,000~41,000；由不同化學方法測定之分子量有所差異。蛋白質含量約佔分子之 85%；其餘為醣類，如 hexose, sialic acid, amino sugar

等。有甚多種別之魚類促性腺激素之氨基酸組成已被分析 (Fontaine and Gerard-Burzawa, 1978)；魚類促性腺激素與哺乳類 LH 及 FSH 之氨基酸組成之比較如表三所示。一般說來，cysteine residues 很高，而 histidine residues 較低；此為共通特性。從氨基酸組成，甚難判定魚類促性腺激素，比較酷似哺乳類之 LH 或 FSH。例如，魚類 GTH 比較酷似哺乳類之 FSH，因為兩者含高量之 aspartic acid 及 glutamic acid，與低量之 arginine，但另一方面，鯉魚之 GTH 酷似哺乳類之 LH，因為兩者含有較多之 proline 及 leucine。至今，尚無人完成魚類 GTH 分子全體氨基酸組成之順序 (sequence)。

Table 3. Comparison of amino acid composition of some fish and mammal gonadotropins (from Fontaine and Gerard-Burzawa, 1978)

Amino acid	cGTH <sup>a</sup>	oncGTH <sup>b</sup>	sGTH <sup>c</sup>	tiGTH <sup>d</sup>	bLH <sup>e</sup>	hFSH <sup>e</sup>
Asp	21	22.6	17.8	21.5	11	15
Thr	16	22.6	15.2	14.4	16	22
Ser	13	13.0	8.9	16.6	14	14
Glu	17	19.4	15.7	22.9	14	22
Pro	19	14.0	11.6	17.2	27	11
Gly	7	11.4	7.0	15.2	11	6
Ala	7	6.4	5.8	15.8	15	12
½-Cys	22	23.8	12.0	7.6	22	22
Val	20	11.8	12.0	14.6	13	13
Met	5	4.8	3.7	6.2	7	4
Ile	5	8.0	7.0	11.4	7	7
Leu	14	9.2	10.0	14.5	14	9
Thr	11	7.6	5.0	6.9	7	11
Phe	6	5.4	5.4	7.1	8	8
Lys	14	11.4	9.8	9.4	12	13
His	6	3.2	6.3	6.1	6	6
Arg	9	5.4	6.9	8.2	11	8
Trp	0	—	—	—	—	—
Total	212	200	160	215	215	203

<sup>a</sup> Data on cGTH are from Jolles *et al.* (1977). Values (expressed in residues per mole) are very close to those previously published (Burzawa-Gerard and Fontaine, 1972) except for methionine and cystine. Destruction during hydrolysis probably explains the lower figures previously found for these for these amino acids.

<sup>b</sup> Data on cGTH are from Pierce *et al.* (1976) (preparation SG DEAEI). Values are expressed as residues per 200 residues.

<sup>c</sup> Data on sGTH are from Breton *et al.* (1976) (preparation t-GTH<sub>2</sub>). Values are expressed as residues mole.

<sup>d</sup> Data on tiGTH are from Farmer and Papkoff (1977). Values are expressed as residues per 215 residues.

<sup>e</sup> Data on bLH and hFSH, calculated from sequences, were taken from Pierce *et al.* (1976).

促性腺激素，由2個次單元 (subunit) 組成： $\alpha$  及  $\beta$  或 I 及 II。可以 8M urea 及 propionic acid 分開 (dissociation)，亦可以 DEAE-sephadex 色譜分析分開 (Fontaine and Gerard-Burzawa 1978; Lo *et al.*, 1981)。次單元本身之生物活性較低。I 型次單元 (subunit I)，即不吸附於 DEAE-sephadex，分子量 14,000，而 II 型次單元 (subunit II) 分子量 17,000；次單元可以複合 (reassociation)，回復到原來整個分子之生物特性 (Fontaine and Gerard-Burzawa, 1978)。法國巴黎 Fontaine 博士實驗室曾經在 carp gonadotropin subunit II 定性  $\text{NH}_2$ -terminal 前 26 個 amino acid sequence，發現鯉魚 GTH 之  $\beta$ -subunit，與哺乳類 LH 及 FSH 之  $\beta$ -subunit 類似，I 型次單元之  $\text{NH}_2$ -terminal 前 33 個 amino acid 分析發現，與哺乳類 LH 及 FSH 類似。因此，以哺乳類 LH, FSH 或 TSH 之  $\alpha$ -subunit 與 carp GTH 之  $\beta$ -subunit 結合，或 carp GTH 之  $\alpha$ -subunit 與 sturgeon (鱘魚) GTH 之  $\beta$ -subunit 結合。但是無法以 carp GTH 之  $\alpha$ -subunit 與哺乳類 LH 或 FSH 之  $\beta$ -subunit 結合。

一般說來，各脊椎動物之 LH, FSH 及 TSH，其  $\alpha$ -subunit 之氨基酸組成極為類似，而  $\beta$ -subunit 差異甚大。 $\beta$ -subunit 是表現該激素特有之生物活性或生理功能；Fontaine 及 Burzawa-Gerard (1978) 提出，carp GTH 之  $\alpha$ -subunit 具有促進 adenylate cyclase activity 之能力，而  $\beta$ -subunit 決定該激素與萊氏細胞之 adenylate cyclase receptor system 之結合能力。

魚類促性腺激素之分子作用方式，一如其他脊椎動物之促性腺素 (LH 及 FSH)，由性腺細胞之細胞膜受納器接受後，產生環腺苷酸 (cyclic AMP) 為第二訊息 (secondary messenger) (Fontaine and Gerard-Burzawa, 1978)；於細胞內再促進其他連續不同之生物化學反應。關於促性腺激素在性腺細胞經由 cyclic AMP 作用之模式，可由圖二表示。

## 五、促性腺激素之分離與純化方法及抗體血清製備

關於魚類促性腺激素分離與純化使用之方法，實驗者多依照哺乳類之方法。自1970年以後，才有比較高純度之促性腺激素出現。近年來，因為精密生物化學及免疫學等儀器及試劑之不斷推出，使純化腦下垂體促性腺激素之純度提高。純化促性腺激素方法可分為下列五種；但是每種方法，並非單獨被使用，多半是綜合採用數種分離方法，先後經過數種步驟，以求更純化。本文介紹(A)一般純化與分離方法，及(B)筆者實驗所使用之方法及魚類促性腺激素純化及抗體製備之簡介。

### A. 一般純化與分離方法

#### 1. 溶劑分級分離法 (solvent fractionation)

使用各種溶劑 (solvent) 及鹽析 (salting out) 作為魚類腦下垂體促性腺激素分離之第一步驟：鯉魚 (Burzawa-Gerard, 1971) 鮭魚 (Donaldson *et al.*, 1972; Yoneda 及 Yamazaki, 1976) 鱘魚 (Burzawa-Gerard *et al.*, 1976a, b) 及其他魚類 (Kobayashi *et al.*, 1985; Yu and Lin, 1986; Banerjee, 1987)。

#### 2. 離子交換色譜法 (ion-exchange chromatography)



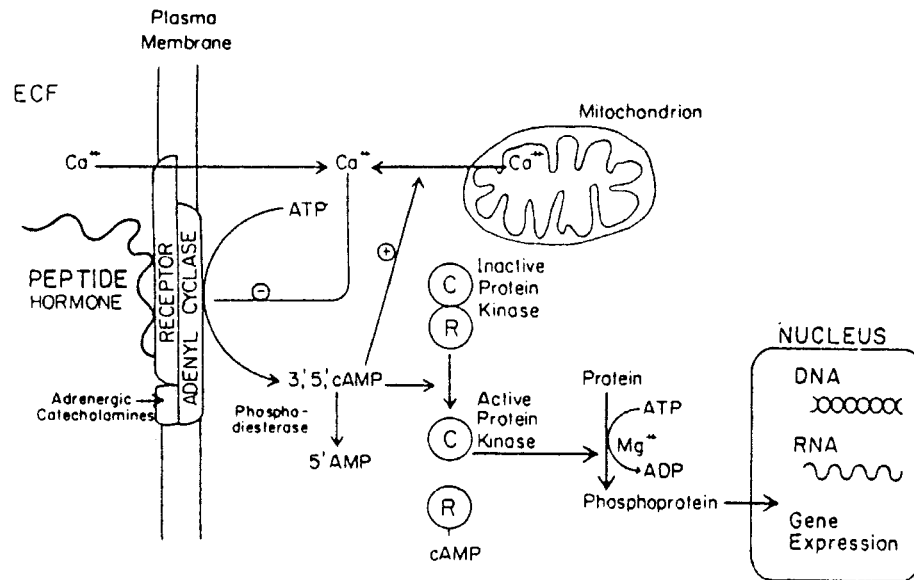


Fig. 2. Proposed cellular mechanism through which a peptide hormone effector might activate gene expression of an endocrine cell. In model shown, binding of peptide to plasma membrane receptor activates adenylyl cyclase, leading to formation of 3', 5'-cyclic AMP and a cascade of reactions leading to conversion of inactive to active protein kinases; kinases then phosphorylate specific proteins. The presumed final active protein in this cascade of reactions is a phosphoprotein that interacts with regulatory sites on the gene, thereby activating gene transcription and expression. C and R refer to catalytic and cAMP-receptor subunits of protein kinase, respectively.

為利用蛋白性激素正負電荷特性 (charge properties) 在色譜柱 (chromatographic column) 中，進行離子交換而達到分離目的；一般說來，使用數種離子交換物質，常用者為：DEAE-cellulose (Burzawa-Gerard, 1971; Donaldson *et al.*, 1972; Breton *et al.*, 1976; Huang *et al.*, 1981; Kobayashi *et al.*, 1985; Yu and Lin, 1986), DEAE-biol-gel A (Idler *et al.*, 1975b; Breton *et al.*, 1978) 或 DEAE-sephadex A-50 (Burzawa-Gerard *et al.*, 1975b)；亦有使用 carboxymethyl cellulose (羧甲基纖維素) (Pierce *et al.*, 1976; Hyder *et al.*, 1979; Idler and Ng, 1979; Kobayashi, *et al.*, 1985), Amberlite CG-50 亦被使用 (Farmer and Papkoff, 1977)。

### 3. 親和色譜法 (affinity chromatography)

最先使用 affinity chromatography 純化魚類促性腺激素，為加拿大 Idler 之實驗室 (Idler *et al.*, 1975b; Ng and Idler, 1979)；使用 Con A-sepharose。然後其他實驗室也跟著使用此法 (Pierce *et al.*, 1976; Breton *et al.*, 1978; Goos *et al.*, 1986)。腦下垂體研磨液中，不被 Con A-sepharose 吸收之部分稱為 Con A I；而被吸收之部分，為 Con A II，該部分可在緩衝液 (buffer) 中加入  $\alpha$ -methyl-D-glucoside 而洗脫 (elution) 出來 (Idler *et al.*, 1975; Pierce *et al.*, 1976)。如果加入蛋白酶抑制劑 (protease inhibitor) 例如 Trasylol 及雙正價離子、鈣 ( $\text{Ca}^{++}$ )、鎂 ( $\text{Mg}^{++}$ )、及錳 ( $\text{Mn}^{++}$ )，使分離效果更好。固定外源凝集素 (immobilized lectin) 亦被使用；係利用  $\alpha$ -D-

glucopyranosyl end groups 或內部之 2-*O*-linked-*D*-manno pyranoly 能篩選吸收 glycoproteins 之特性，而使無或低碳水化合物之蛋白質不被吸收在柱內。如加入 ethylene glycol (50% v/v)，使從 Con A II 之回收率提高。Idler 及其同事認為 Con A-sepharase 優於其他傳統性之純化方法，以酒精萃取及沉澱法 (Stockell-Hartree, 1966) 因 glycoprotein hormone 與 protein hormone 可明顯分離，極少混雜。其他種類之 immobilized lectins (有不同碳水化合物能力)，已被測試過者，如 lentil lectin-sephadex, wheat germ-lectin, sepharose, helix pomatia lectin-sepharose。最近印度西孟加爾大學 Bhattacharya 教授及其博士研究生 Banerjee 進而使用免疫親和色譜法 (immunoaffinity chromatography) 純化魚類之促性腺激素 (Banerjee, 1987)。

#### 4. 凝膠層析法 (gel filtration)

在分離與純化之步驟中，使用 gel filtration，是利用蛋白質內分泌素 (如促性腺激素) 分子量大小之特性。Sephadex G-100 或 G-75 被廣泛使用 (Burzawa-Gerard, 1971; Idler *et al.*, 1975b; Yoneda and Yamazaki, 1976; Farmer and Papkoff, 1977; Banerjee, 1987)。少數人使用 ultrogel AcA54 或 AcA 44 (Breton *et al.*, 1976; Ng and Idler, 1979; Goos *et al.*, 1986)。在分離比目魚 (flounder) 時，因分子量較高 (60,000)，而使用 ultrogel 比 Sephadex G-75 分離得更好。

#### 5. 製備聚丙烯醯胺凝膠電泳動法 (preparative polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

在純化過程中之某一步驟，使用電泳動分離法，以純化魚類促性腺激素 (Burzawa-Gerard, 1971; Huang *et al.*, 1981)。

### B. 鯉魚及鱧魚促性腺激素之純化與抗體製備

筆者實驗室曾分離與純化鱧魚及鯉魚腦下垂體促性腺激素 (Yu and Lin, 1986)，純化方法是綜合使用溶劑法與離子交換色譜法 (圖三)；簡言之：採集之魚類腦下垂體，貯存於丙酮 (acetone)，經吹乾後，研磨於醋酸胺—酒精溶劑，再經 24 小時之萃取，以酒精沉澱糖蛋白激素 (glycoproteins)，其中含有促性腺激素及促甲狀腺素，再經過 DEAE-cellulose (Whatman DE52) 離子交換色譜分析及 Fractogel TSK CM-650(S) 離子交換色譜分析。所得分級分離溶液以紫外光譜分光光度測定法 (UV spectrophotometry)，追蹤促性腺激素，出現位置總共得到 3 個尖峯 (peak)；而經生物活性檢定，測知促性腺激素多集中於第 1 個尖峯位置。

生物活性測定，是以離體鯉魚精巢雄性素生成系統 (見本文「生物活性測定」)；生物活性甚高，鱧魚及鯉魚促性腺激素分別為 0.2 ng 及 1.2 ng，即可促進顯著的雄性素生成。將純化後之鱧魚促性腺激素，在大白兔引發抗體血清，獲得高力價之抗體。將該促性腺激素以放射性碘-125 碘化後，測定與其他魚類促性腺激素之結合交互反應 (cross-reactivities)，其結果示於圖四。鱧魚促性腺激素抗體與鯉魚促性腺激素反應最好，其次為鱧魚促性腺激素。其餘魚類，如灰海鰻、鮭魚之促性腺激素交互反應極低。至於哺乳類之促性腺激素，反應非常低微，如孕馬血清促性腺激素 (PMSG)、羊促黃體激素 (O-LH)；甚或幾無交互反應，如人類胎盤絨毛促性腺激素 (HCG)。從這免疫反應

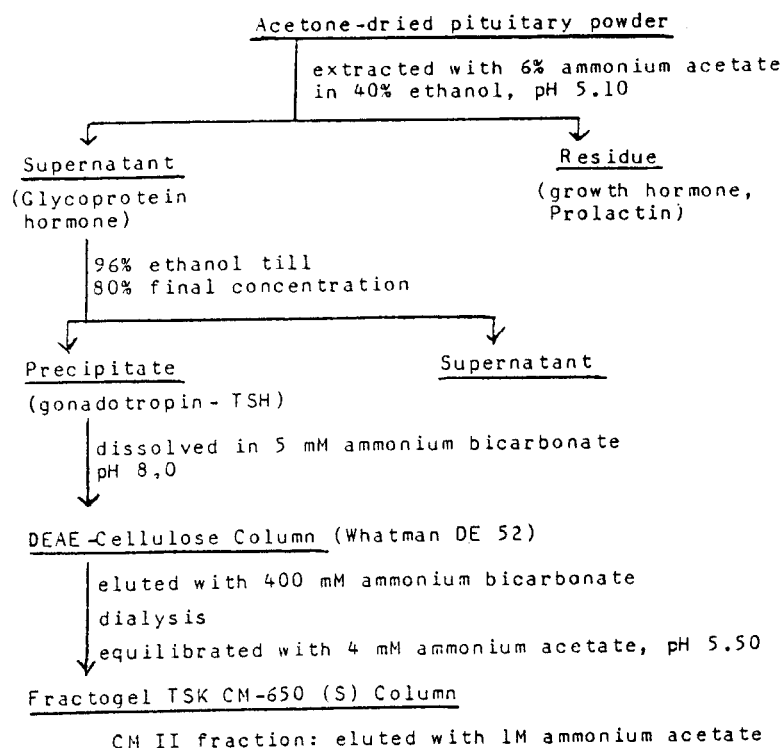


Fig. 3. Flow chart for purification of pituitary gonadotropins from common carps and silver carps.

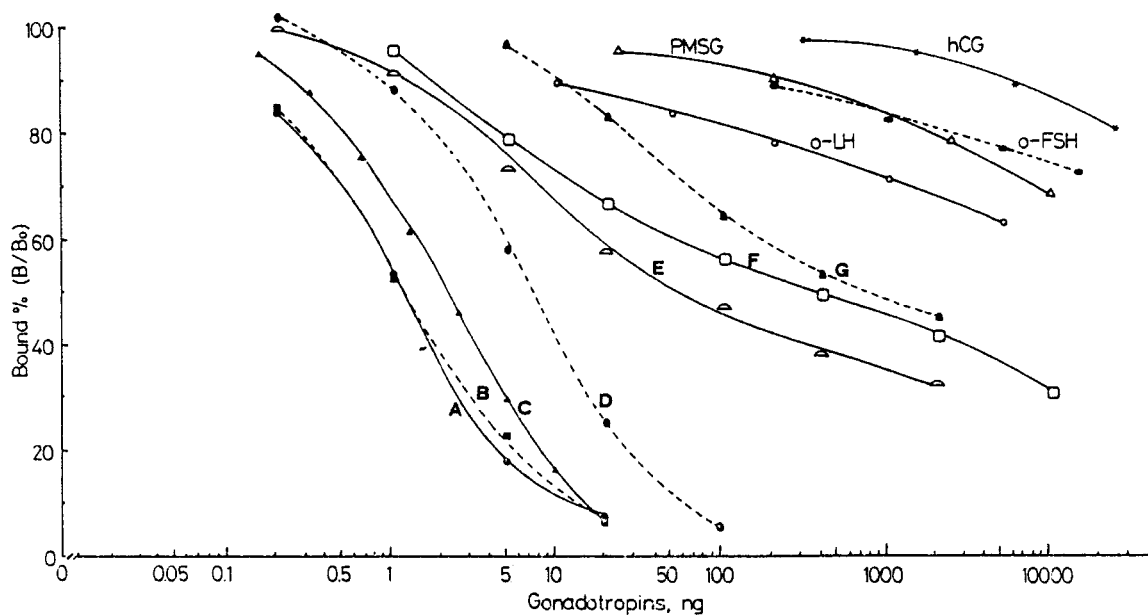


Fig. 4. Cross reactivities of antiserum against the silver carp gonadotropin (ASIZ-HM-G1). The purified silver carp gonadotropin was iodinated (I-125) and incubated with the antiserum together with increasing doses of unlabelled piscine and mammalian gonadotropins. The data are expressed as the displacement curves. A. Common carp GTH (ASIZ-CC-G1, Yu and Lin, 1986); B. Common carp GTH (Chang and Huang, 1982); C. Silver carp GTH (ASIZ-HM-G1, Yu and Lin, 1986); D. Silver carp GTH (Huang); E. Pike ell GTH (Huang *et al.*); F. SG-G100; G. Salmon GTH (Syndel). (Yu, unpublished data).

，亦可約略窺出脊椎動物腦下垂體促性腺激素分子之種別演化 (phylogenetic evolution) 之程度。本抗體血清所建立之放射性免疫法，其敏感度甚高；純化之鯉魚及鱖魚促性腺激素，分別約為 100 及 200 picograms/ml 即可被測定出來。本抗體血清，可測定這些魚類血液中之促性腺激素濃度，以追蹤該激素分泌之型態。Kobayashi *et al.* (1985) 亦發展鱖魚促性腺激素之抗體血清，而作為金魚血液中促性腺激素之測定。

## 六、促性腺激素之生理功能

了解促性腺激素之生理功能後，可利用其生物特性建立活體或離體生物活性方法，回過來定性與定量促性腺激素之生物活性及/或純度。

### 1. 精子生成 (spermatogenesis)

哺乳類精子生成，需要濾泡激素及雄性素之存在。在硬骨魚類，鮭魚之 SG-G100 (部分純化之促性腺激素) 及鯉魚促性腺激素皆可促進精子生成 (Sundararaj *et al.*, 1971; Burzawa-Gerard, 1974; Leloup-Hatey *et al.*, 1981)。鮭魚之 MGTH 可使切除腦下垂體之比目魚開始精子生成 (Upadhyay, 1977)。吳郭魚之 GTH 亦促進切除腦下垂體之吳郭魚精子生成 (Hyder *et al.*, 1979) Ng 及 Idler (1980) 報告 MGTH 促進雄魚產生高濃度之雄性素：11-ketotestosterone 及 testosterone，但雌魚則不能。許多實驗室指出，注射促性腺激素，以提高精巢生成雄性素，促進精子生成作用，比直接注射雄性素至魚類，其效應較為強烈。因此，魚類生精作用必須由促性腺激素及雄性素共同作用以完成。

### 2. 排精 (spermiation)

魚類促性腺激素促進成熟精子排出體外。切除腦下垂體的金魚，SG-G100 促性腺激素可刺激其排精 (Yamazaki and Donaldson, 1969)，利用此功能，可作為測定促性腺激素之活體生物活性 (見本文「生物活性」項目)。在鱒魚，排精時血中雄性素濃度升高 (Sanchez-Rodriguez *et al.*, 1978)，所以，硬骨魚之促性腺激素引發排精作用，可能與精巢雄性素生成有關聯。鮭魚之 MGTH 能促進切除腦下垂體之比目魚排精及精巢雄性素生成 (Ng *et al.*, 1980)。

### 3. 精巢雄性素生成 (testicular androgen synthesis)

哺乳類之 LH，能促進精巢精間細胞 (interstitial cell) 或稱萊氏細胞 (Leydig cell) 生成與分泌雄性素 (余玉林, 1981; Yu *et al.*, 1981a)。魚類促性腺激素涵蓋 LH 之功能，因此也控制其精巢雄性素生成。魚類精巢之組織與細胞，大體上與其他高等脊椎動物 (如哺乳類) 一樣；由精間細胞生成雄性素 (圖五)。GTH 與精間細胞之受納器 (receptor) 結合後，引發 cyclic AMP 之生成 (圖六)；再經由其他步驟促進許多類固醇生成酶 (steroidogenic enzymes) 之產生及活化，而使類固醇 (cholesterol) 生成雄性素 (androgen)，如 testosterone, 11-ketotestosterone 等。細胞內之粒腺體 (mitochondria) 及平滑微粒體 (smooth microsome)，負責生成類固醇激素 (圖七)。活體注射魚類促性腺激素到不同種別之硬骨魚，多能促進雄性素生成 (Ng and Idler, 1980; Leloup-Hatey *et al.*, 1981)。離體培養魚類精巢組織或精間細胞，接受魚類促性腺激素刺激而產生雄性素，除作為離體生物活性測定外 (見「生物活性測定」項目)，亦供探討促性腺

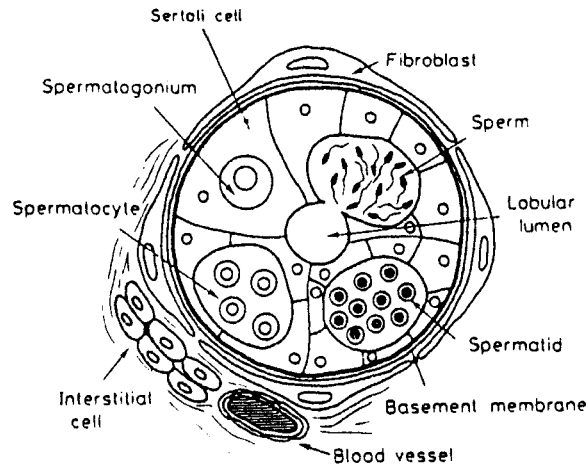


Fig. 5. Diagrammatic representation of a portion of a testis of the tubular type demonstrating a close relationship between germ cells at various stages of development and Sertoli cells. Interstitial cells are located in the interstitium. (From Nagahama, 1983)

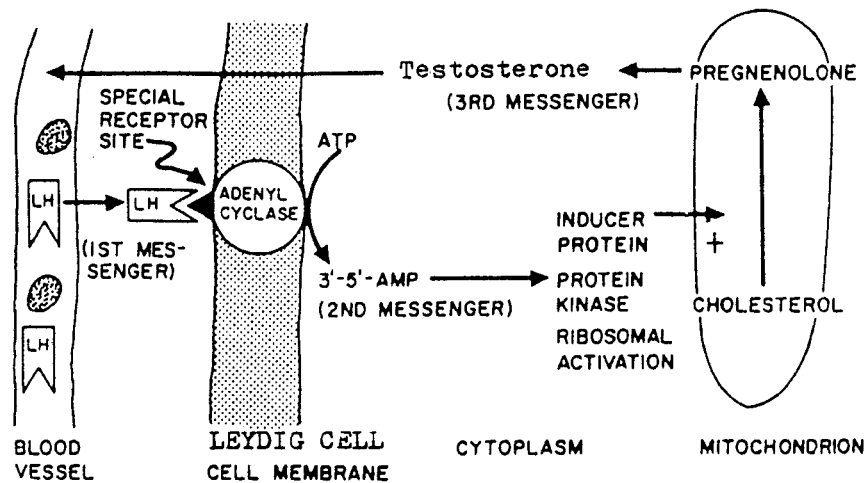


Fig. 6. Model to show how a-specific receptor site binds a particular hormone (LH in this case). The target organ (testicular leydig cell membrane) contains a hormone-specific receptor protein as part of its adenyl cyclase system. Binding of LH results in activation of adenyl cyclase with a resulting increase in the production of cAMP (second messenger). The cAMP then activates the protein kinase in that particular cell which leads to testosterone (third messenger) production by the mitochondrion.

激素及其他因子控制精巢雄性素生成與分泌之步驟與機制。

4. 卵巢雌性素生成 (ovarian estrogen synthesis)

許多魚類卵巢生成雌二醇 (estradiol-17 $\beta$ ) 已被確認 (Gottfried, 1964; Lupo and Chieffi, 1963; Horvath *et al.*, 1978; Kagawa *et al.*, 1982)。哺乳類卵巢濾泡內之細胞雌性素生成，其中最普遍之步驟為 LH，促進膜細胞 (theca cell) 生成雄性素；而 FSH 促進顆粒狀細胞 (granulosa cell) 內之雄性素轉成雌性素 (圖八)。此為 Falck (1959)

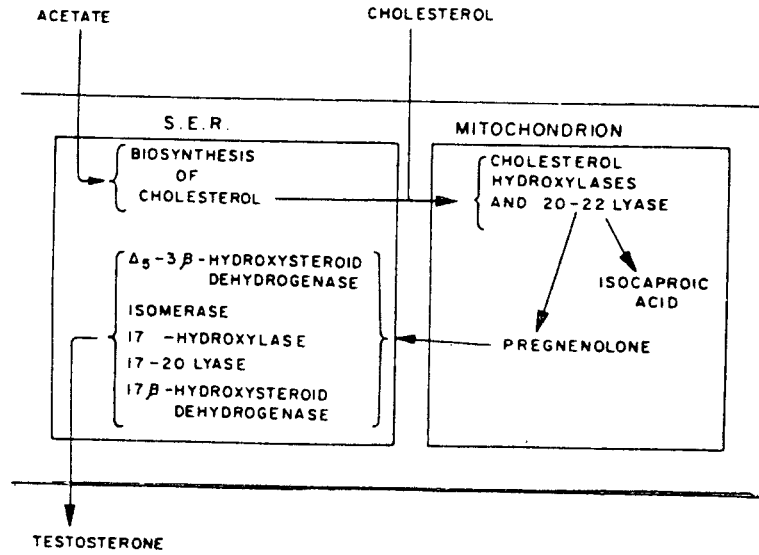


Fig. 7. Diagram illustrating the enzymes present in subcellular organelles (smooth endoplasmic reticulum and mitochondrion) involved in steroidogenesis in the interstitial cells of the testis.

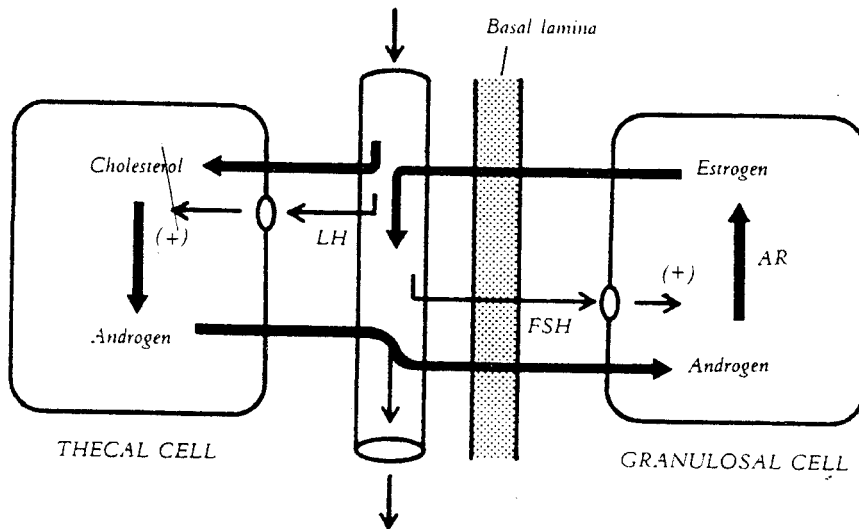


Fig. 8. Synthesis of steroids by the ovarian follicle. Conversion of cholesterol to androgens is stimulated in the thecal cell by LH. Androgens must diffuse through the basal lamina that separates the thecal cell and vascular supply from the granulosa cell. Under the influence of FSH the granulosa cell converts androgens to estrogens using aromatase (AR). (From Norris, 1985)

所提出，而此模式現今被廣泛使用；此即所謂「兩種激素及兩種細胞」模式 (two gonadotropin-two cell model)。魚類在這方面之研究，起步甚晚。近年來，日本之 Nagahama 博士在魚類此方面之研究貢獻良多，從鮭魚離體卵巢研究，指出兩種細胞（即膜細胞及顆粒狀細胞）都參與雌性素生成 (Nagahama *et al.*, 1982)，因此，他們提出此「兩種細胞」模式（圖九）；而在鱒魚，也發現如此。在魚類，或許是「一種激素及兩

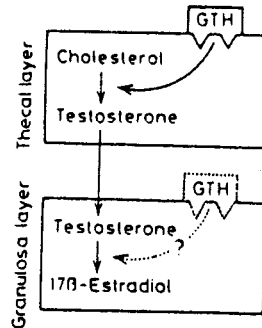


Fig. 9. Two cell-type model for the synthesis of follicular  $17\beta$ -estradiol in the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). (From Nagahama, 1983)

種細胞」模式 (one gonadotropin-two cell model)。

#### 5. 卵黃前質生成與卵黃生成 (vitellogenesis and egg yolk formation)

魚類 GTH 促進卵黃生成雌性素，而由後者在肝臟促進卵黃前質生成，再由促性腺激素，使卵黃前質進入卵子而形成卵黃 (egg yolk)。由雌性素控制肝臟卵黃前質生成，是所有卵生脊椎動物（從圓口類、軟骨魚、硬骨魚、兩棲類、爬行類至鳥類）共通現象 (Yu *et al.*, 1981b)；從兩棲類以上至鳥類，由 FSH 負責使卵黃前質在卵泡內形成卵黃。由於 Idler 及同事發現，魚類第二種促性腺激素，即 vitellogenic gonadotropin (VGTH)，能促進卵黃前質形成卵黃；因此，魚類 VGTH 之作用，或可認為相當於其他較高等卵生脊椎動物 FSH 之作用。

#### 6. 卵子成熟及排卵 (egg maturation and ovulation/spawning)

魚類促性腺激素促進卵巢濾泡產生誘導成熟類固醇 (maturation-inducing steroids)，由此作用於卵子 (oocyte) 之表面，而引起排卵。發現  $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one 是主要誘導成熟之類固醇激素 (Goetz, 1983; Nagahama, 1983)。另外， $17\alpha$ -hydroxyprogesterone 亦有作用。在卵子最後成熟期間，魚類血液中，該上述二種類固醇激素顯著增加，而與卵子成熟有關聯 (Campbell *et al.*, 1980)。促性腺激素直接作用於 granulosa cell 生成  $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (Young *et al.*, 1983)；因此，Nagahama 之實驗室提出魚類 GTH 促進卵泡 thecal layer 生成前質，可能是  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone；該前質進入 granulosa layer 再轉變為  $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (Nagahama, 1983)。但是，此「誘導成熟類固醇」與促性腺激素共同促進排卵 (ovulation)；如果單獨使用該誘導成熟類固醇，只引起部分排卵，不能引起排卵 (DeMontalambert *et al.*, 1978; Jalabert *et al.*, 1978)。在哺乳類及鳥類排卵過程中，攝護腺素或稱前列腺素 (prostaglandins) 扮演主要角色；在魚類，亦有些研究，但仍不十分清楚。

### 七、生物活性測定

定量促性腺激素方法有數種：放射性免疫法 (radioimmunoassay, RIA)，放射性受納器法 (radioreceptor assay, RRA)，及生物測定法 (biological assay) 等。免疫測定法，是利用抗原——抗體結合特性；而受納器結合法係利用精巢或卵巢細胞膜受納器

接受促性腺激素之特性，但嚴格來說，還不算是生物活性測定。生物測定法，則利用促性腺激素之生理功能，以活體動物或分離之性腺組織/細胞，讓促性腺激素表現其特有生理功能。例如促進精巢精間細胞生成與分泌雄性素，卵巢產生雌性素，排卵或排精等功能；也只有生物測定，才能真正表現激素之純度與活性強度。在分離與純化，或應用促性腺激素或製備該激素，必須有可靠，簡單及標準之生物活性檢定方法。該法可分為活體 (*in vivo*) 及離體 (*in vitro*) 兩類；一般說來，活體方法敏感度較差，所需測試之促性腺激素劑量較大，但是方法較簡單；而離體法敏感度極高，只需極微劑量之促性腺激素即可，但是需要較多設備及生物技術方法。在純化與分離過程中，多用離體生物活性法以定量及追蹤促性腺激素之純度與活性。

#### A. 活體生物活性測定

即使用魚類或其他脊椎動物，以檢定促性腺激素之生物活性。例如，魚類排精 (Yoneda and Yamazaki, 1976)，魚類精巢吸水 (Clemens and Grant, 1964)，小鷄精巢之磷吸收 (Donaldson *et al.*, 1972)，蛙類排精與排卵 (Fontaine and Gerard-Burzawa, 1978)，魚類排卵 (Sundararaj and Goswami, 1966; Sundararaj *et al.*, 1972a, b, c; Lam *et al.*, 1978; Kime and Dolben, 1985)，魚卵成熟 (Sundararaj and Nayyar, 1976; Ng and Idler, 1979)，卵黃生成 (Sundararaj *et al.*, 1972b; Campbell and Idler, 1976; Ng and Idler, 1978)。本文介紹魚類排精法，小鷄精巢之磷吸收法及鱒魚產卵器延伸。

##### 1. 魚類排精法 (spermiation)

選擇性成熟雄性比目魚 (flounder)，沒有排精徵候之腦下垂體切除 (hypophysectomy) 處理後第 6 天，注射促性腺激素；48 小時後，以手指輕壓雄魚腹部，檢查有無排精現象，係由生殖孔流出魚精 (milt)。Yamazaki 及 Donaldson (1968) 以金魚 (gold fish) *Carassius auratus* 之排精現象，作為促性腺激素生物活性檢定。以鮭魚腦下垂體抽出物，0.001~0.03 mg/10 g 體重，注入至「腦下垂體切除」後 6 天之金魚，可引起排精。HCG 100 IU 以上/10 g 體重，引起 100% 反應。每天檢查排精現象，連續 6 天，以手輕壓生殖孔，前後部位 3 次，視查定是否有排精。

##### 2. 小鷄精巢放射性磷吸收法 (chick radiophosphate uptake)

加拿大 Donaldson 博士在純化與分離鮭魚促性腺激素時使用此法；係根據 Florsheim (1959) 及 Breneman (1962) 等，經 Follet 及 Farmer (1966) 修改。即以  $^{32}\text{P}$  ortho-phosphate 注射入一日齡小公鷄，取睪丸測定  $^{32}\text{P}$  吸收量。小公鷄孵化 12 小時後，皮下注射 2 次測試之促性腺激素 (0.2 ml，每隔 12 小時 1 次)，第 2 次促性腺激素注射前 6 小時，注射 3~4  $\mu\text{Ci}$   $^{32}\text{P}$ ，第 2 次注射後 12 小時，取睪丸組織，以放射性閃爍計數器定量放射性磷-32，其敏感度為 1.0  $\mu\text{g}$  NIH-LH-S1，而 FSH 必須 10 倍量才能產生類似 LH 引起之反應。

##### 3. 鱒魚產卵器延伸 (ovipositor elongation)

鱒魚 (鯉科，體型甚小) (Rose bitlerling, *Rhodeus ocellatus ocellatus*)。在生殖季節，雌魚產卵器 (ovipositor) 延伸 (圖十)，產卵於河蚌 (freshwater pond mussel)



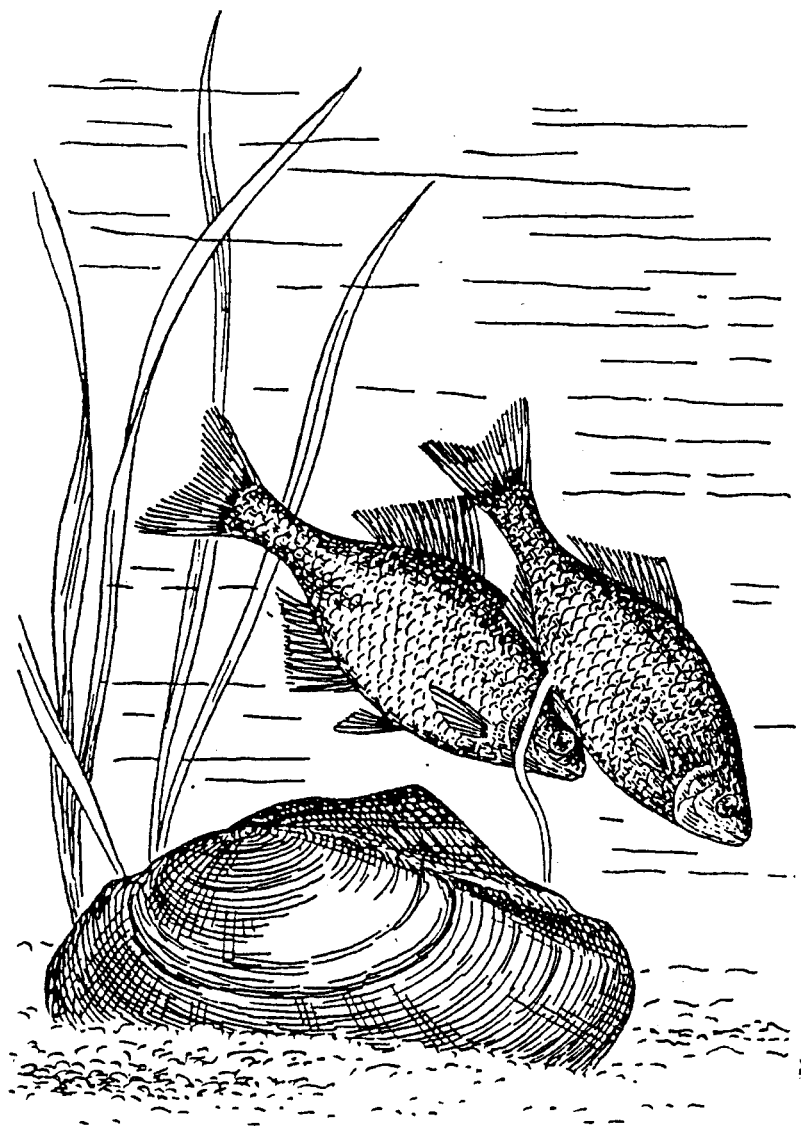


Fig. 10. Male and female Bitterling (*Rhodeus sericeus*) with freshwater pond mussel,  $\times \frac{2}{3}$ . The female is about to deposit eggs. (From Norman and Greenwood, 1931)

中(Norman and Greenwood, 1931)；早於西元1940年代，鱒類即被當作哺乳動物之類固醇生殖激素之生物活性測定之動物(Duyvene de Wit, 1940; Bretschneider and Duyvene de Wit, 1947)。而最近，日本東京大學農學部漁業科 Aida 氏實驗室 (Asahina *et al.*, 1983) 報告該法亦適於作魚類促性腺激素生物活性測定，如圖十一所示，產卵器比例 (ovipositor ratio) 與純化中之鮭魚促性腺激素之各分離部分 (Aida *et al.*, 1980) 有劑量相關。皮下注射促性腺激素 24 或 48 小時後，測定產卵器延伸長度比例。高度純化之鮭魚促性腺激素 (SIAGCDSS)，其生物活性，比未純化者 (aceton powder) 高 55 倍；哺乳類之 prolactin, ACTH, TSH 及神經腦下垂體分泌之激素不能引起反應；但是高劑量之哺乳類 LH 及 HCG (人類胎盤絨毛促性腺激素) 却有效應。因此，其特異性

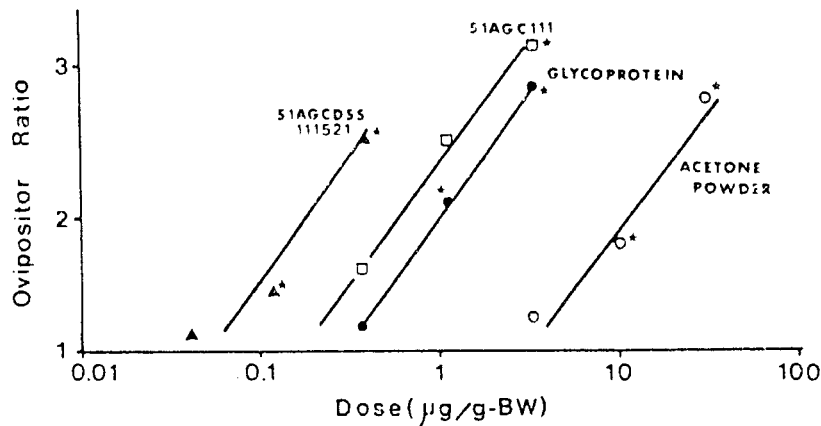


Fig. 11. Dose-response curves of various salmon gonadotropin preparations by the bitterling ovipositor elongation test. \*, ovulation. (From Asahina *et al.*, 1983)

相當高，可做為魚類促性腺激素之生物活性測定，而且敏感度相當高。

魚類促性腺激素，能促進產卵器伸長，係因其先促進卵巢生成類固醇激素，如某些  $C_{21}$ -steroids,  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone 或  $17\alpha$ -hydroxy- $20\beta$ -dihydroprogesterone 等。如圖十二所示；這些類固醇激素引起產卵器伸長之作用時間非常迅速，而也同時促進卵子最後成熟 (final oocyte maturation) 及/或排卵 (ovulation)。

## B. 離體生物活性測定

利用性腺組織或細胞，在體外培養，接受促性腺激素生成類固醇激素、環腺苷酸，或是卵子在培養情況下成熟進度等方法，作為促性腺激素之生物活性強度與純度之測定。

### 1. 離體卵巢或精巢環腺苷酸產生測定法 (gonadal cyclic AMP formation *in vitro*)

鯉魚及鮭魚之促性腺激素在西元 1970 年時，即被證實可促進金魚卵巢，在離體狀況下產生環腺苷酸 (cyclic AMP) (Fontaine *et al.*, 1970, 1972, 1981)，此法之敏感度在  $20^{\circ}\text{C}$  時，為 0.5 microgram carp-gonadotropin/ml。圖十三，表示環腺苷酸生成與促性腺激素之劑量相關。

也可使用魚類精巢接受促性腺激素，而產生 cyclic AMP (Menon 及 Smith, 1971; Idler *et al.*, 1975a)，其敏感度約為 0.01 microgram/ml。Idler *et al.* (1975a)，曾利用性未成熟鱒魚 (Trout) 性腺 (30~50 mg/1.3 ml)，培養液中含有 8 mM theophylline，與測試之促性腺激素一齊培養於震盪水槽，在  $10^{\circ}\text{C}$  下，經 1 小時；測定 cyclic AMP 產生量，其敏感度為 0.5 SG unit (1 SG unit=1 microgram NIH-CH-S18 in chick bioassay)。金魚、鮭魚、鰻、鱒之精巢與卵巢都可接受促性腺激素產生 cyclic AMP，而作為離體方法，測定促性腺激素之生物活性。

### 2. 離體卵巢雌二醇生成 (ovarian estradiol formation *in vitro*)

魚類卵巢在離體培養情況下，接受促性腺激素刺激後，產生有劑量相關之雌性素 (estrogen) 作為促性腺激素生物活性之測定 (Fostier *et al.*, 1979; Yaron and Barton, 1980; Kagawa *et al.*, 1982; Bona-Gallo and Licht, 1981)。

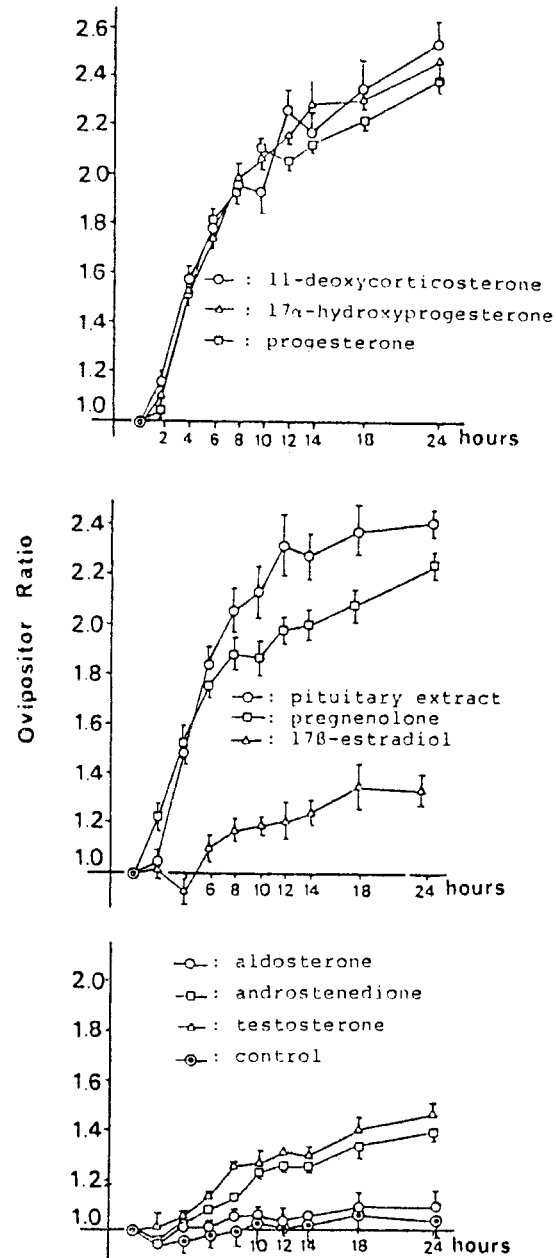


Fig. 12. Elongation patterns of ovipositor following the administration of steroids or salmon pituitary extract. Each value represents mean  $\pm$  standard error of five fish. Steroids were dissolved in ambient water (20 ng/ml) and pituitary extract (glycoprotein, 2  $\mu$ g/g body wt; Aida *et al.* (1980)) was injected intraperitoneally. Only solvent was added to the control group. (From Asahina *et al.*, 1983)

以色列之 Yaron 博士實驗室 (Bogomolnaya and Yaron, 1984) 報告，以歐利亞吳郭魚 Cichlid fish (*Sarotherodon aureus*) 之卵巢作此類生物活性檢定工作；一次利用 7~20 尾魚之卵巢切碎，以每試管盛入 40~50 mg 之切碎卵巢，每試管中含有 1.5 ml 培養液，在前 3 小時，更換 3~4 次培養液後，在 30°C 下培養 3 小時；以放射性

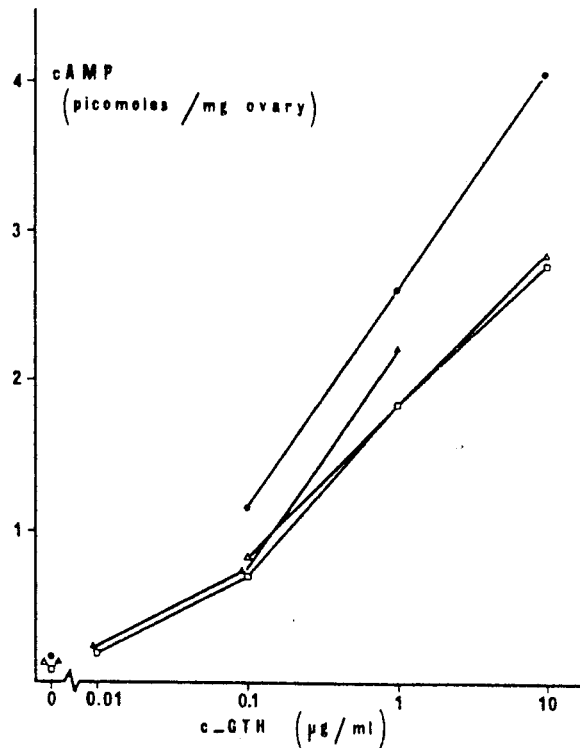


Fig. 13. Increase in cAMP concentration in fragments of eel ovary incubated with cGTH: dose-response relationships (Fontaine-Bertrand *et al.*, 1978). About 100 mg of ovary was incubated for 20 min at 20°C in 4 ml Krebs-Ringer bicarbonate buffer, pH 7.4, including bovine serum albumin (1 mg/ml), glucose (1 mg/ml), theophylline (20 mM), and various amounts of cGTH. At the end of the incubation, ovarian samples were transferred into 0.5 ml of boiling tris-HCl (50 mM)/EDTA (4 mM) buffer, pH 7.5, for 3 min and homogenized after being cooled. The suspension was centrifuged 10 min at 0°C, and cAMP was assayed in the supernatant according to the method described by Tovey *et al.* (1974). Each point corresponds to the mean of two cAMP determinations done on the same supernatant. Each curve (●, ▲, △, □) corresponds to results obtained in a single eel. (From Fontaine and Gerard-Burzawa, 1978).

免疫法定量雌二醇生成，如圖十四所示。以鯉魚之促性腺激素，羊之促黃體素或 cyclic AMP，都可促進卵巢產生有劑量相關之 estradiol。

Bogomolnaya 及 Yaron (1984) 亦將歐利亞吳郭魚卵巢之切片作周流灌注培養，追蹤雌二醇之分泌型態，給予促性腺激素刺激，可使雌二醇之生成與分泌，亦呈劑量相關；此法為周流灌注培養，所需技術較前述固定培養法繁且深；因此適合於探討性腺類固醇激素生成與分泌時間型態及作用機制調節，比較不適用於促性腺激素之離體生物活性檢定。

筆者實驗室，也曾探討鯉魚卵巢雌二醇生成，作為魚類促性腺激素之離體生物活性檢定。鯉魚（體重 810 g, GSI 35.6%，卵巢重 288 g），未排卵，每培養試管含有 12 個濾泡，在 25°C，每分鐘震盪 100 次，在 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> 下培養 4 小時，以放射性免疫法測定雌二醇產生，如圖十五所示，雌二醇產生量與鯉魚促性腺激素，有良好劑

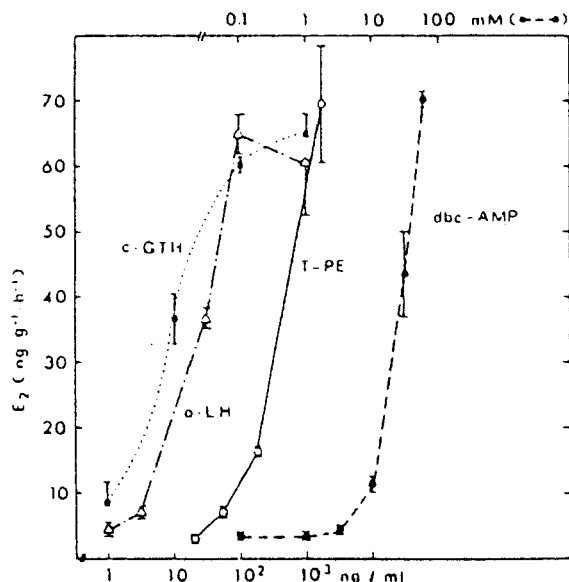


Fig. 14.  $E_2$  output by incubated ovarian tissue of *S. aureus* in response to various concentrations of tilapia pituitary extract (T-PE), carp GTH (cGTH), and ovine LH (bottom abscissa) and dbcAMP (top abscissa). The medium contained also IBMX (0.5 mM). Each point and bar represent the mean  $\pm$  SEM of three incubation tubes. (From Bogomolnaya and Yaron, 1984)

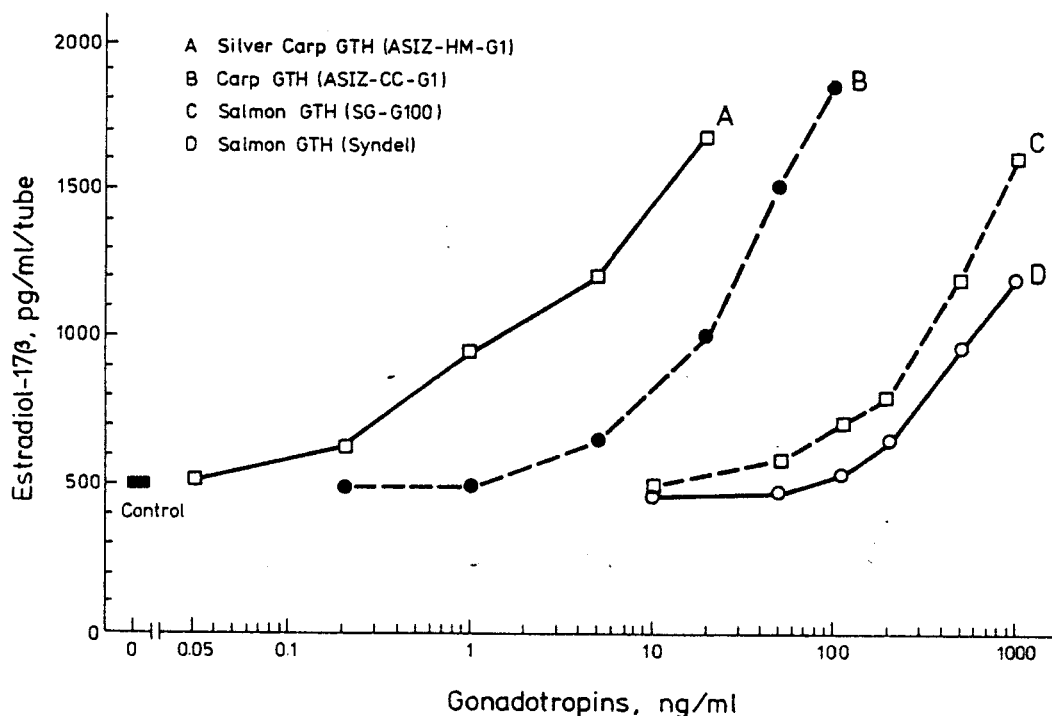


Fig. 15. Effects of various piscine gonadotropins on estradiol- $17\beta$  production by preovulatory ovarian follicles from common carp. Each incubation tube contained 10–12 follicles and was incubated for 4 h at 25°C. The data represent a single experiment of duplicate incubations (Yu and Lin, unpublished data).

量相關。其敏感度約為 0.3 nanogram/ml；但是根據筆者實驗室之經驗，卵巢濾泡雌二醇生成測定法之再現性，遠不如精巢雄性素生成法好。

### 3. 鯉魚精巢離體培養類固醇生成 (*in vitro* testicular steroidogenesis of common carp)

脊椎動物精巢（睪丸）組織或細胞在離體培養情況下，能接受促性腺激素，而產生雄性素。

一般說來，哺乳類如大鼠（rat）或小鼠（mouse）之精間細胞，接受魚類促性腺激素產生雄性素之能力極低（Farmer and Popkoff, 1977; Huang *et al.*, 1981; Yu and Wang, 1978）。但是對哺乳類促性腺激素之接受能力則非常強（Yu *et al.*, 1981a; 1984），此與種別演化遠近有關。而魚類精巢對魚類促性腺激素接受力強，促進雄性素生成能力高（Bona-Gallo and Licht, 1981; Chang and Huang, 1982; Kime and Hyder, 1983; Yu and Lin, 1985）。

筆者實驗室近年來從事甚多種別動物之精巢組織或細胞培養，作為脊椎動物促性腺激素之雄性素生成能力比較。比較過鯉魚、鯽魚及塘虱魚精巢雄性素生成之差異（Yu and Lin, 1985）。在此簡介鯉魚精巢組織培養之雄性素生成系統，作為魚類促性腺激素之生物活性檢定與種別性比較。另外，又發現魚類精巢助孕素之生成亦可作為生物活性檢定，一併在此介紹。

曾經比較①切片法（slicing），②打碎法（mincing），③磨碎法（homogenization），④打碎及膠原酶處理（mincing and collagenase dispersion）。在此簡介精巢打碎法之準備步驟（Yu and Lin, 1986）：如圖十六所示，磨碎法之雄性素生成能力最差，而以切片法最好。但為方便計，筆者實驗室採用打碎法。

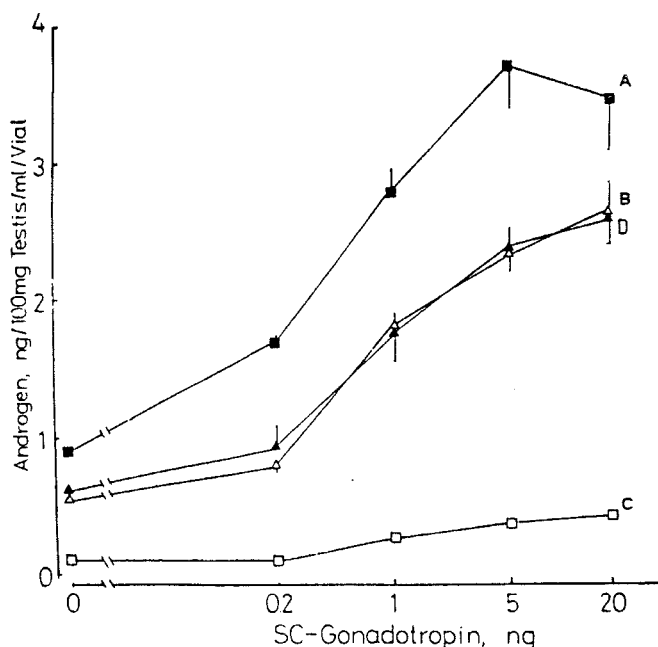


Fig. 16. The effect of various methods in common carp testis preparations on androgen formation capacity. A. Sliced; B. Minced; C. Homogenized; D. Minced and collagenase dispersed (mean  $\pm$  SEM,  $N=3$ ). (Yu and Lin, 1986).

a). 離體鯉魚精巢培養準備與雄性素生成 (testicular androgen formation by common carp testis *in vitro*)

取雄性鯉魚 2~3 尾 (體重 400~1100 g), 性腺體重比 (GSI), 8.3~30.3%; 殺死後取出精巢, 以剪刀將精巢切成塊狀, 每塊約 1 克重, 浸於培養皿 (Petri dish), 該培養皿內已先盛入培養液 (Hank's balanced salt solution, HBSS), 事先通混合氣 (95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>) (精巢組織與培養溶液比例約為 1:1), 再以切碎機 (Osterizer blade blender) 切碎 3 次, 每次約 1 秒鐘。靜置後, 倒去乳狀上清液, 加入新鮮 HBSS 後, 以注射筒溫和抽送精巢打碎液, 再以 HBSS 洗。沉澱精巢組織細胞, 預先培養於 medium A (medium 199, with Hank's salts, L-glutamine, penicillin 10,000 units/100 ml, streptomycin 5 mg/100 ml, 0.1% bovine serum albumin, 0.2% glucose; 25 mM Hepes, and 10% sodium bicarbonate 1 ml/100 ml, pH 7.40), 在 25°C 經 1 小時; 上清液倒除後, 沉澱細胞培養於 medium B (medium A containing 2 mM theophylline), 在 25°C 下連續通氣與震盪 (每分鐘 100 次); 再遠心分離, 留取上清液, 以放射性免疫測定法, 定量雄性素及助孕素生成量。以各劑量之鯉魚促性腺激素與鯉魚精巢細胞共同培養; 如圖十七所示, 雄性素生成之時間過程, 在培養 4 小時後, 雄性素生成達到飽和, 雖再培養 8 小時, 雄性素生成量不再增加。各劑量促性腺激素促進雄性素生成, 在各段培養時間內, 都有平行比例相關; 一般培養, 採用 2~4 小時。

爲了探討鯉魚精巢精間細胞在培養 4 小時後所分泌之雄性素, 是在培養後新生成 (de novo synthesis) 抑或培養前已生成, 而在培養時才分泌; 曾從事一試驗; 除測定培養液中雄性素以外, 尚以乙醚萃取細胞內之雄性素。如圖十八所示, 在培養前, 精間組織細胞內所含雄性素量極低; 如不加入促性腺激素培養, 4 小時後, 其雄性素含量只升高些許, 但如與各劑量之促性腺激素一齊培養, 細胞及培養液中均有升高的雄性素。這些結果, 顯示鯉魚精巢精間細胞, 與促性腺激素培養後, 才開始顯著地新生成雄性素; 同時, 生成後, 三分之二分泌至培養液。因此, 測定培養液中之雄性素, 即可獲得良好之

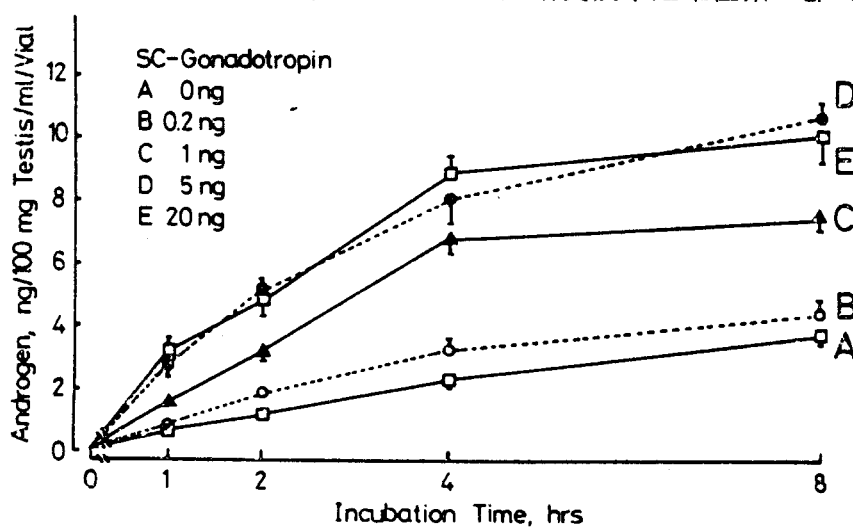


Fig. 17. Time course pattern of scGTH-evoked androgen production by minced carp testis preparation. The data are expressed as mean  $\pm$  SE from three separate incubations. (From Yu and Lin, 1986)

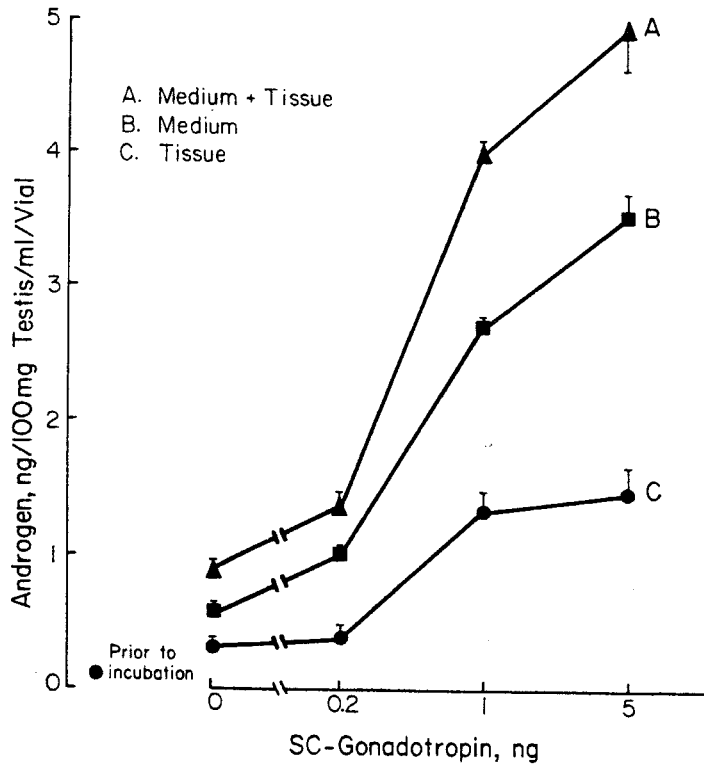


Fig. 18. Changes in androgen content in testicular tissue and in medium following 4-hr incubation of minced common carp testis on stimulation by scGTH. At the end of incubation, the cell suspension was centrifuged, and the tissue pellet was homogenized with a Polytron homogenizer followed by diethylether extraction. The radioimmunoassay of androgen content in medium and in testis is described under materials and methods. The data are expressed as mean  $\pm$  SE from three separate experiments. (From Yu and Lin, 1986)

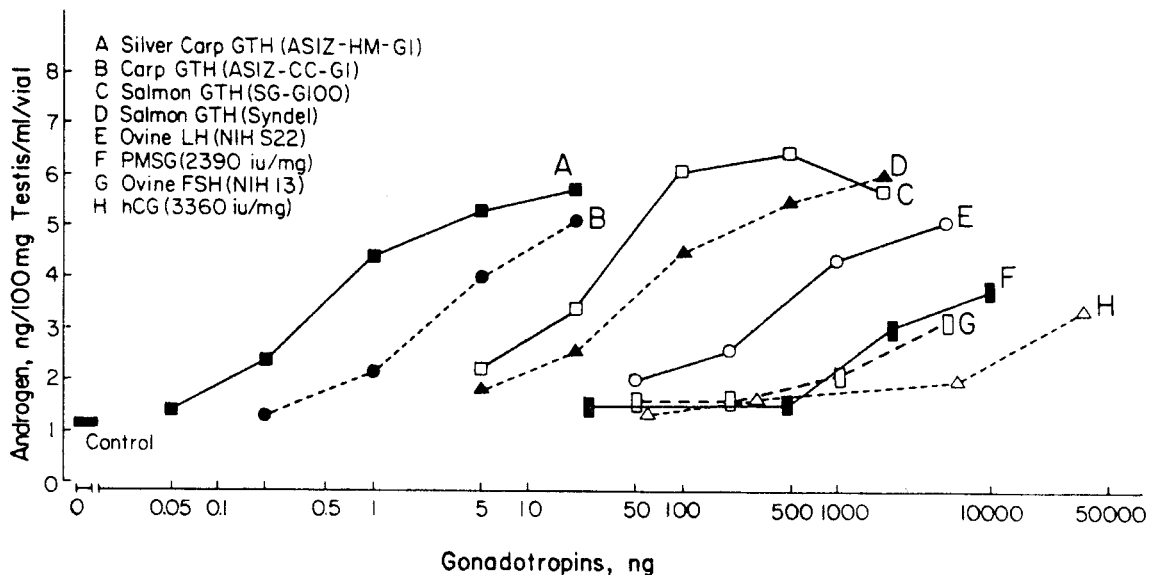


Fig. 19. Comparative effects of various piscine and mammalian gonadotropins on androgen formation by minced carp testis. The data represent a single experiment of duplicate incubations. (From Yu and Lin, 1986)



劑量相關。圖十九表示，某些魚類及哺乳類促性腺激素促進鯉魚精巢雄性素生成能力之比較。鱧魚促性腺激素生物活性最強，即使最少劑量，也可促進顯著的雄性素生成。其次則為鯉魚促性腺激素，而鮭魚促性腺激素則較次之；至於哺乳類促性腺激素，如PMSG, HCG, ovine LH 則殿後，必須高劑量，才可引起鯉魚精巢雄性素生成。哺乳類與魚類，在種緣上相差甚遠，因此魚類精巢精間細胞，對哺乳類促性腺激素之接受力較差，必須高劑量才能引起反應。此結果，也從旁解釋了為何在使用哺乳類促性腺激素（如 puberogen 或 gona-hormone）作為魚類催熟，排精與排卵時，必須高劑量才有效果。一尾一公斤的魚，一般言之，需要 500~1000 IU 的 HCG 引發排卵；此即所謂種別性差異。促性腺激素分子構造與精間細胞膜上受納器，隨著種別演化而有改變；但是還保留相似，因此魚類精間細胞，還能多少接受哺乳類促性腺激素產生類固醇激素。

#### b). 助孕素生成 (progesteroid formation)

因為助孕素為雄性素生成之前質 (precursor)；因此筆者從事鯉魚精巢雄性素生成培養系統時，也同時定量助孕素之產生，發現助孕素生成與促性腺激素亦有良好劑量相關；此法尚未有人報告。其敏感度比雄性素還高，而且其基礎助孕素產量（無促性腺激素刺激時）與給予促性腺激素刺激後之產量差距比雄性素要大。助孕素可以免疫測定法（放射性或酵素法均可）。如圖二十所示；魚類之促性腺激素能促進鯉魚精巢助孕素產生能力，與雄性素者極相類似。換句話說，促性腺激素促進助孕素生成能力之高低或強弱次序，與促進雄性素者完全一樣。因此，以離體之鯉魚精巢助孕素生成系統，亦是準確且方便之魚類促性腺激素生物活性檢定方法。

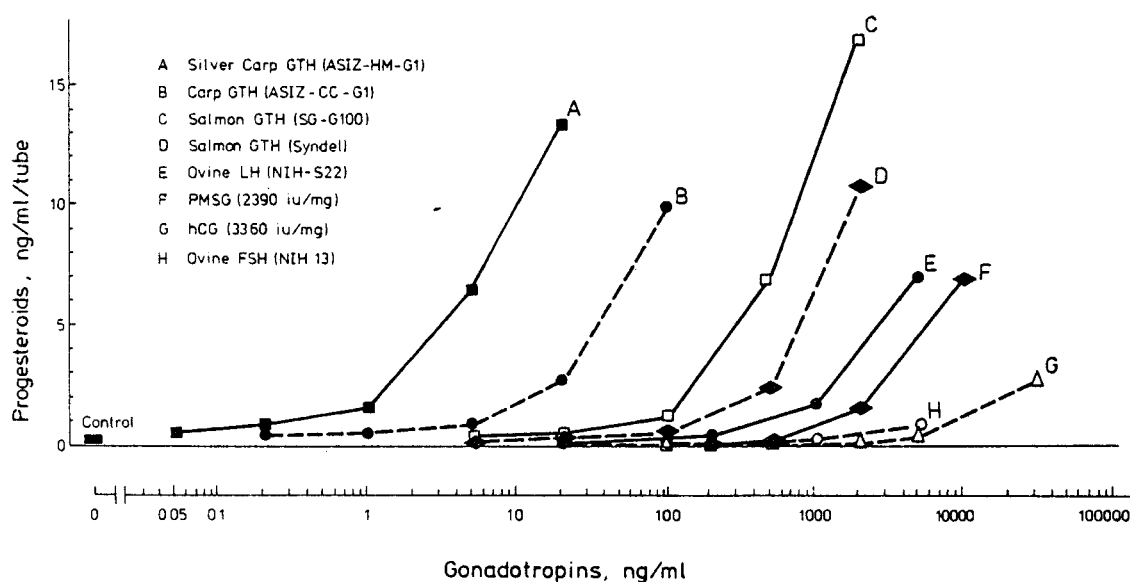


Fig. 20. Comparative effects of various piscine and mammalian gonadotropins on progesteroid production by minced common carp testis *in vitro*. The data represent a single experiment of duplicate incubations. (Yu and Lin, in preparation).

#### 4. 離體雞精巢組織雄性素生成 (rooster testicular androgen formation *in vitro*)

利用魚類精巢雄性素生成作為魚類促性腺激素生物活性檢定，因為係同一綱類 (class)，因此敏感性很高，即少量促性腺激素可促進雄性素生成；但是魚類生殖受季節控制，適當且正發育期間之性腺取得比較困難，因此不能隨時被利用作生物活性檢定。而使用實驗室動物，如小白鼠、大白鼠之精巢雄性素生成系統，其對魚類促性腺激素之反應甚差；因此筆者實驗室，首度探討以雞睪丸組織，作為魚類促性腺激素生物活性檢定 (Yu and Wang, 1983; 1984)。發現雞睪丸組織精間細胞，能接受魚類促性腺激素，而促進雄性素產生，且有良好劑量相關，其敏感度雖不如使用魚類精巢高，但還是相當靈敏。其方法：將性成熟之公雞睪丸取出，切片 (每片約 20 mg) 後以每試瓶 (vial) 含 1 ml 培養液內放置 100 mg 睪丸組織 (5 至 6 片)，在 37°C 下，連續通以 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> 混合氣，每分鐘震盪 100 次。亦可以攪拌混懸液 (minced preparation) 代替切片 (即將精巢組織經剪碎後，以 magnet stirrer 溫和轉動攪拌，經 1 小時 (22~24°C)，吸取部分混懸液作培養。經 4 小時培養後，定量雄性素生成量。如圖二十一所示，鱒魚、鯉魚、鮭魚都能促進雞睪丸精間細胞，產生劑量相關之雄性素，其敏感度約

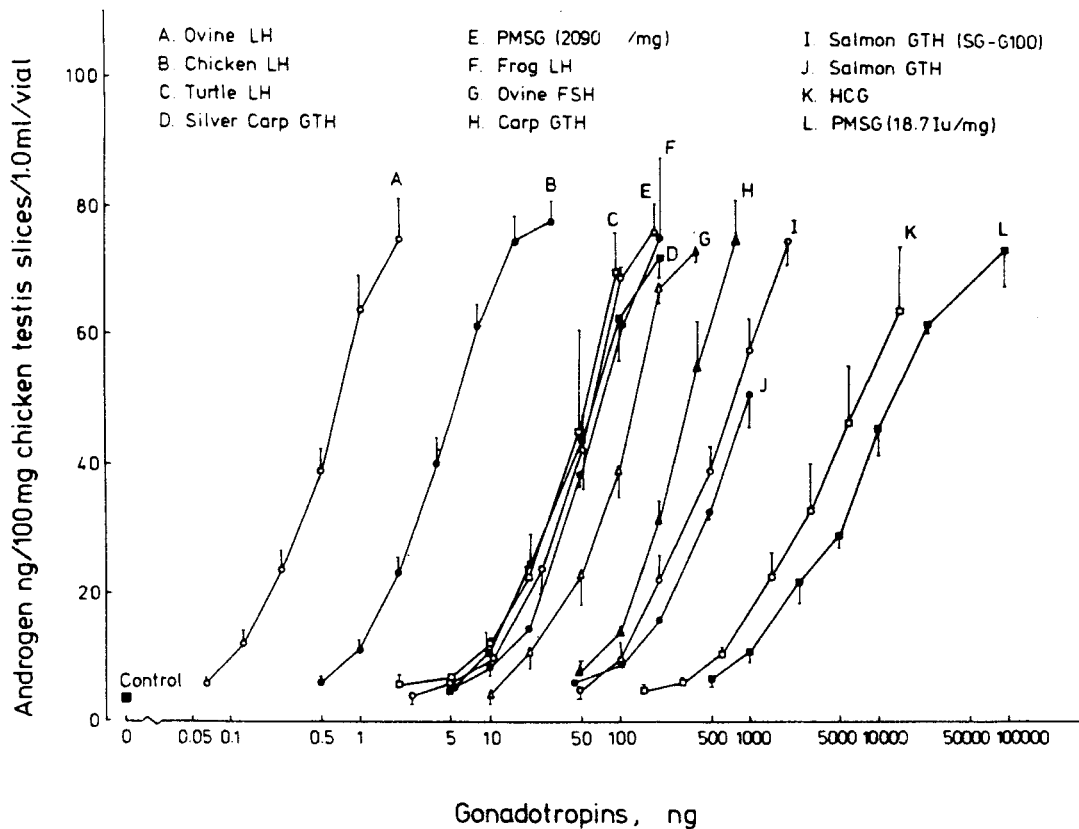


Fig. 21. Comparative effects of diverse vertebrate gonadotropins (GTHs) on androgen formation from rooster testicular slices. The data are expressed as mean  $\pm$  SEM. The numbers of incubation experiments for each hormone are indicated in Table 3. All hormone preparations assayed are expressed on the basis of weight. (From Yu and Wang, 1987).

分別為 8, 40 及 60~90 nanogram/ml。鷄精巢精間細胞，對各種脊椎動物之促黃體激素，都能接受而產生雄性素；為目前所有脊椎動物之精巢，最具親和力與廣泛接受性者。因此適於各種脊椎動物促性腺激素之離體生物活性測定之用。又因鷄隻獲取容易，不必受季節影響，其反應亦佳，是一方便之測試動物 (Yu and Wang, 1987)。

#### 5. 離體魚卵成熟法 (fish oocyte maturation *in vitro*)

卵子在發育過程中，經過卵黃形成期以前 (previtellogenic growth phase) 及卵黃形成期 (vitellogenic growth phase) 時，卵子 (oocyte) 擴大，外層濾泡層 (follicular layers) 發育，卵黃形成。而在卵黃形成期開始以後，或此期之後面部分，迄至排卵以前，卵子繼續成熟；此步驟稱為卵子最後成熟 (oocyte final maturation)。在卵黃形成期，卵核 (nucleus) 或稱為生發泡 (germinal vesicle) (圖二十二)，從卵子中間移動至邊緣；在核移至卵子邊緣之後，開始分散，此現象稱為生發泡破裂 (germinal vesicle breakdown, GVBD)。如本文前述，此步驟由促性腺激素促進卵泡之 follicular layer 產生卵子最後成熟類固醇 (oocyte final maturation steroids 或 maturation-inducing steroids)。再由此類固醇引發卵子最後成熟；利用此原理，可作為促性腺激素之生物活性檢定。

利用米鱒魚 (medaka, *Oryzias latipes*) 卵子在離體情況下，以促性腺激素引發 GVBD 之原理，作促性腺激素之生物活性檢定。有關研究指出，米鱒魚之完全發育之卵子，可接受低濃度促性腺激素或類固醇之刺激 (Hirose, 1971, 1972)。Hirose 與 Donaldson (1972) 指出，鮭魚促性腺激素，SG-G100，在低濃度 40 mg/ml，可促進 medaka 在離體狀況下引發 GVBD 及 ovulation。Hirose (1980) 報告在 20~28°C，長日照情況下，每日都會排卵。每日上午 10 時，下午 1, 5, 9 及 11 時，將魚犧牲後，立即取出卵巢，放進 medium 199 培養液 (pH 7.3)，其中含 10% 犢牛血清 (calf serum)，以解剖針將卵泡中之卵子取出 (每尾魚有 10~20 卵子)，可供生物測定。在 CO<sub>2</sub>

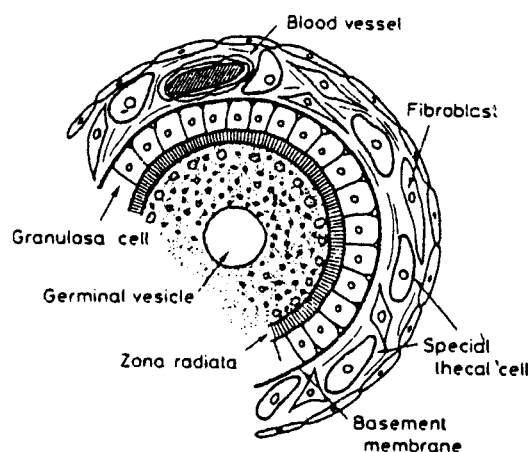


Fig. 22. Diagrammatic representation of the follicle layer surrounding an early vitellogenic oocyte of salmonid fishes. The granulosa layer is separated from the thecal layer by a distinct basement membrane. The thecal layer is composed of fibroblasts, blood vessels, etc., and large special thecal cells. (From Nagahama, 1983)

incubator (空氣中, 含 5% CO<sub>2</sub>), 25°C, 10~13 oocyte/3 ml 培養液/培養皿, 加入測試之促性腺激素一齊培養, 經 24 小時後, 在解剖顯微鏡下觀察 GVBD 之情況, 如圖二十三所示, %GVBD 與促性腺激素劑量, 有良好劑量相關。

6. 離體鱧魚卵巢非脂化膽固醇消竭法(*in vitro* depletion of nonesterified cholesterol from murrel ovary)

印度 Mukherjee Bhattacharya (1981) 建立此法。將淡水鱧魚 (Murrel. *Channa punctatus*) 以 SG-G100 (半純化鱧魚促性腺激素) 注射, 而使該魚卵巢之非脂化(游離)膽固醇 (cholesterol) 消竭; 有良好之劑量相關, 而在離體培養狀況下, 亦有劑量

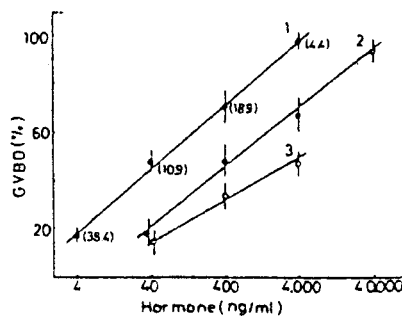


Fig. 23. Log dose-response curves for the *Oryzias* oocytes incubated with SG-G100 and LH. (1) curve obtained by incubating the oocytes with SG-G100 at 13:00 hr; (2) oocytes with SG-G100 at 10:00 hr; (3) oocytes with LH at 10:00 hr. At each concentration 4 to 5 experiments were conducted, and vertical bars indicate the SEM. The percentage coefficient of variation is indicated in parentheses. (From Hirose, 1980)

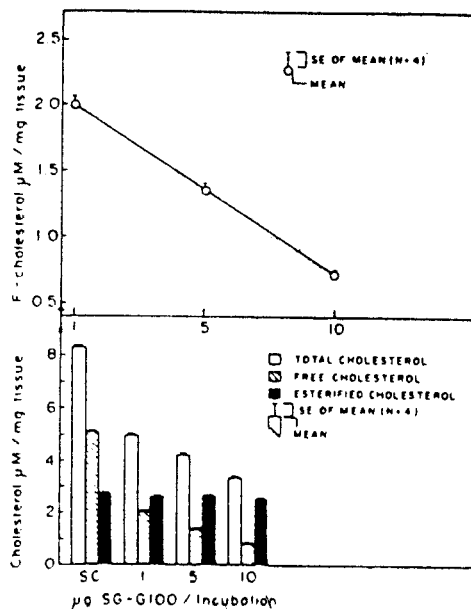


Fig. 24. Profile of total, free, and esterified cholesterol in response to increasing SG-G100 concentrations (histogram). Curve above the histogram shows the pattern of f-cholesterol mobilization in this experiment. (From Mukherjee and Bhattacharya, 1981)

相關，鱧魚卵巢在離體培養狀況下，游離膽固醇消竭之最大反應，是在卵巢含有 40~50% 成熟卵子時期。如圖二十四及二十五所示，以 SG-G100 從 1.5 至 10 microgram/incubator，可引發良好劑量相關之游離膽固醇消竭。其後 Deh *et al.* (1985) 解釋此法之基礎與原理，係由於促性腺激素，利用膽固醇作為類固醇生成 (steroidogenesis) 之原料。Banerjee (1987) 再度改進此法之敏感度；以放射性標識之膽固醇 ( $^{14}\text{C}$ -cholesterol) 處理，再測定其轉變成放射性之 pregnenelone。

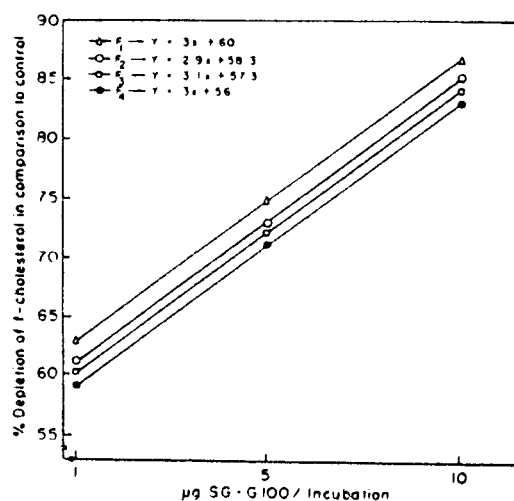


Fig. 25. f-Cholesterol depletion in response to increasing SG-G100 doses in four individual ovaries from four different murels. F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> and F<sub>4</sub> indicate the serial number of fish. (From Mukherjee and Bhattacharya, 1981)

## 八、結 論

魚類腦下垂體促性腺激素被純化之種別愈來愈多。如不使用親和色譜法，都得到單一型促性腺激素；但由於使用親和色譜分離法，却可得到兩型：一為促性腺成熟激素，另一為促卵黃形成激素。前者類似哺乳類之 LH，能促進卵泡成熟與類固醇生成作用；而後者之功能，却不與哺乳類 FSH 相同，但與兩棲類及鳥類卵生動物之 FSH 之功能却相當接近；因此，需要更多純化與分離之研究及生物活性追蹤，以確定魚類促性腺激素之類型，生理作用及種別演化意義。

目前所使用之活體或離體生物活性測定法，以定性或定量促性腺激素，種類繁多。不論是純化分離促性腺激素或其構造及生物活性之研究或製備激素，作為魚類繁殖應用，都以使用離體生物測定法為宜；因為敏感度及準確度都高。以容易獲得之魚類（養殖者，如鯉魚；觀賞者，如金魚）或是以舉世普遍飼養之雞之精巢雄性素生成法（筆者實驗室所建立者），亦極為適當。

無論是化學方法分離或正在熱門之遺傳工程，所生成之促性腺激素，都必須經過生物測定，以檢定其活性強度。臺灣地區魚類養殖普遍，種類亦多，而在促性腺激素之純化及活性追蹤上，亦有技術與經驗；如能更進一步研究與發展此一領域，對魚類生殖之基礎與應用，都會有高度貢獻。

## 九、誌 謝

承行政院農業委員會及中央研究院支助筆者執行魚類生殖內分泌之研究。撰稿期間，承中央研究院動物所李信徹博士諸多協助，一併誌謝。

## 十、引用文獻

- 余玉林 (1981). 睪丸雄性素之生成與調節，中央研究院生物中心舉辦「動物之激素與生殖」研討會論文專集，45-79 頁。
- 余玉林 (1986). 海洋脊椎動物生殖內分泌研究之近況與展望，海洋生物科學學術研討會論文集，國科會生物科學研究中心專刊第 14 集，73-89 頁。
- Aida, K., Asahina, K., Nishina, H., Sakai, H. and Ishii, S. (1980). Isolation and purification of salmon gonadotropin. *Zool. Mag.*, **89**(4): 513.
- Asahina, K., Hanyu, I., Aida, K., Nishina, H. and Kobayashi, H. (1983). Effects of hypophyseal, placental, hypophysiatropic, and steroid hormone on ovipositor elongation and ovulation in the Rose Bitterling, *Rhodeus ocellatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **52**: 426-437.
- Banerjee, P. P. (1987). Assay and purification of murrel and carp gonadotropic hormone, ph D. Thesis (University of Visva-Bharati, India).
- Bogomolnaya, A. and Yaron, Z. (1984). Stimulation *in vitro* of estradiol secretion by the ovary of a Cichlid fish, *Sarotherodon aureus*. (1984). *Gen. Comp. Endocrinol.* **53**: 187-196.
- Bona-Gallo, A. and Licht, P. (1981). Gonadotropin specificity of *in vitro* testosterone secretion by fish testes. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **43**: 467-478.
- Breneman, W. R., Zeller, F. J. and Creek, R. O. (1962). Radioactive phosphorus uptake by chich testes as an end-point for gonadotropin assay. *Endocrinology.*, **71**: 790-798.
- Breton, B. (1981). A study of salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) pituitary gonadotropin dissociation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **45**: 147-152.
- Breton, B., Prunet, P. and Reinaud, P. (1978). Sexual differences in salmon gonadotropin. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* **18**(4): 759-765.
- Breton, B., Jalabert, B. and Reinaud, P. (1976). Purification of gonadotropin from rainbow trout (*Salmo gairdnerii* Richardson) pituitary glands. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, **16**(1): 25-36.
- Bretschneider, L. H. and Duyvene de Wit, J. J. (1947). "Sexual Endocrinology of Nonmammalian Vertebrates," pp. 6-30, Elsevier, Amsterdam.
- Burzawa-Gerard, E. (1971). Purification d'une hormone gonadotrope hypophysaire de poisson téléostéen, la carpe. *Cyprinus carpio* L. *Biochimie.*, **53**: 545-552.
- Burzawa-Gerard, E. (1974). Etude biologique et biochimique l'hormone gonadotrope d'une poisson téléostéen, la Carpe (*Cyprinus carpio* L.). *Mem. Mus. Natl. Hist. Nat., Ser. A (Paris)*. **86**: 1-77.
- Burzawa-Gerard, E., Goncharov, B. F. and Fontaine, Y. A. (1975a). L'hormone gonadotrope hypophysaire d'un poisson chondrostéen, l'esturgeon (*Acipenser stellatus* Pall.). I. Purification. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **27**: 289-295.
- Burzawa-Gerard, E., Goncharov, B. F. and Fontaine, Y. A. (1975b). L'hormone gonadotrope hypophysaire d'un poisson chondrostéen, l'esturgeon (*Acipenser*

- stellatus* Pall.). II. Propriétés biochimiques. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **27**: 296-304.
- Campbell, C. M. and Idler, D. R. (1976). Hormonal control of vitellogenesis by hypophysectomized winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaum). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **28**: 143-150.
- Campbell, C. M. and Idler, D. R. (1977). Oocyte maturation and ovulation induced in hypophysectomized winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) by preparations from pituitary glands of American plaice (*Hippoglossoides platessoides*). *J. Fish. Res. Board Can.*, **34**: 2125-2155.
- Chang, Y.-S. and Huang, F. L. (1982). The mode of action of carp gonadotropin on the stimulation of androgen production by carp testis *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **48**: 147-153.
- Clemens, H. P., Ciereszko, L. S., Shoemaker, J. D. and Grant, F. B. (1964). Partial characterization of the gonadal hydration principle in the pituitary of carp. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **4**: 503-507.
- Deb, S., Jamaluddin, MD., Bhattacharya, S., Bhadra, R. and Datta, A. G. (1985). Bioassay of fish gonadotropin by ovarian mitochondrial cholesterol depletion. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **57**: 491-497.
- De Montalambert, G., Jalabert, B. and Bry, C. (1978). Precocious induction of maturation and ovulation in northern pike (*Esox lacius*). *Ann. Biol. Anim., Biochim. Biophys.*, **18**: 969-975.
- Donaldson, E. M., Yamazaki, F., Dye, H. M. and Philleo, W. W. (1972). Preparation of gonadotropin from salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) pituitary glands. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **18**: 469-481.
- Duyvene de Wit, J. J. (1940). A quantitative and qualitative test for steroid hormones based on the ovipositor reaction of the female bitterling (*Rhodeus amarus* Bloch). *J. Endocrinol.*, **2**: 141-156.
- Falck, B. (1959). Site of production of oestrogen in rat ovary as studied in micro-transplants. *Acta Physiol. Scand.*, **47**, Suppl. **163**: 1-101.
- Farmer, S. W. and Papkoff, H. (1977). A teleost (*Tilapia mossambica*) gonadotropin that resembles luteinizing hormone. *Life Sci.*, **20**: 1227-1232.
- Florsheim, W. H., Velcoff, S. M. and Bodfish, R. E. (1959). Gonadotropin assay on augmentation of radiophosphate uptake by the chick testes. *Acta. Endocrinol.*, **30**: 175-182.
- Follett, B. K. and Farner, D. S. (1966). Pituitary Gonadotropins in the Japanese Quail (*Coturnix japonica*) during photoperiodically Induced Gonadal Growth. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **7**: 125-131.
- Fontaine, Y. A. and Burzawa-Gerard, E. (1978). Biochemical and biological properties of fish gonadotropins and their subunits: Comparison with mammalian hormones. In "Structure and Function of the Gonadotropins" (M. W. McKerns, ed.), pp. 361-380. Plenum, New York.
- Fontaine, Y. A., Burzawa-Gerard, E. and Delerue-Le Belle, N. (1970). Stimulation hormonale de l'activité adényl cyclasique de l'ovaire d'un poisson téléostéen, le cyprin (*Carassius auratus* L.), *C. R. Acad. Sci. Paris Ser. D.* **271**: 780-783.
- Fontaine, Y. A., Salmon, C., Fontaine-Bertrand, E. and Marchelidon, J. (1981). The mechanism and the specificity of action of pituitary gonadotropins. *Abstr. Pap. Int. Symp. Comp. Endocrinol.*, 9th. 1981 p. 2.

- Fontaine, Y. A., Salmon, C., Fontaine-Bertrand, E., Burzawa-Gerard E., and Donaldson, E. M. (1972). Comparison of the activities of two purified fish gonadotropins on adenyl cyclase activity in the goldfish ovary. *Can. J. Zool.*, **50**: 1673-1676.
- Fostier, A., Breton, B. and Jalabert, B. (1979). Stimulation hypophysaire de la sécrétion oestradiol-17 $\beta$  chez la carpe commune, *Cyprinus carpio* L. *Ann. Endocrinol.*, **40**: 83-84.
- Goetz, F. W. (1983). Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation fish physiology (eds. by Hoar, W. S., Rendall, D. J. and Donaldson, E. M. Vol. IX. Reproduct. PLB Behavior and Fertility Control.
- Goos, H. J. TH., de Leeuw, R., Burzawa-Gérard, E., Terlouw, M., and Richter, C. J. J. (1986). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **63**: 162-170.
- Gottfried, H. (1964). The occurrence and biological significance of steroids in lower vertebrates. *A Review. Steroids.*, **3**: 219-242.
- Grönlund, W. (1969). Biological assay and partial characterization of the gonadotropic factors of the pituitary gland of Pacific salmon (*Oncorhynchus*). M. Sc. Thesis, University of Washington, Seattle.
- Haider, S. G. and Blüm, V. (1977). On the evolution of the pituitary gonadotropin system in lower vertebrates. *Invest. Pesq.*, **41**, 185-204.
- Hattingh, J. and DuToit, P. J. (1973). Partial separation of the pituitary proteins of *Labeo umbratus* Smith (mudfish). *J. Fish. Biol.*, **54**: 41-47.
- Hirose, K. (1971). Biological study on ovulation *in vitro* of fish. I. Effects of pituitary and chorionic gonadotropins on ovulation *in vitro* of medaka, *Oryzias latipes*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **37**(7): 385-391.
- Hirose, K. (1972). Biological study on ovulation *in vitro* of fish. V. Induction of *in vitro* ovulation in *Oryzias latipes* oocytes removed from their follicular tissues. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **38**: 1091-1096.
- Hirose, K. (1980). A bioassay for teleost gonadotropin using the germinal vesicle breakdown (GVDB) of *Oryzias latipes* oocytes *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **41**: 108-114.
- Hirose, K. and Donaldson, E. M. (1972). Biological study on ovulation *in vitro* of fish. III. The induction of *in vitro* ovulation of *Oryzias latipes* oocytes using salmon pituitary gonadotropin. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **38**: 97-100.
- Hoar, W. S. (1969). Reproduction. In "Fish Physiology" (W. S. Hoar and D. J. Randall, eds.) Vol. 3, pd. 1-72. Academic Press, New York.
- Horváth, L., Poteczín, E., Fehér, G. K. and Fehér, T. (1978). Isolation and quantitative determination of sex hormones in carps (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.*, **29**: 23-27.
- Huang, F.-L., Huang, C.-J., Lin, S.-H., Lo, T.-B. and Papkoff, H. (1981). Isolation and characterization of gonadotropin isohormones from the pituitary gland pike eel (*Muraenesox cinereus*). *Int. J. Pept. Protein Res.*, **18**: 69-78.
- Hyder, M. (1970). Histological studies on the testes of pond specimens of *Tilapia nigra* (Gunther) (Pisces: Cichlidae) and their implications on the pituitary-testis relationship. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **14**: 198-211.
- Hyder, M., Shah, A. V. and Hartree, A. S. (1979). Methallibure studies on Tilapia. III. Effects of Tilapian partially purified pituitary gonadotropic fractions on the



- testes of methallibure-treated *Sarotherodon spirulus* (= *Tilapia nigra*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **39**: 475-480.
- Idler, D. R. and Ng, T. B. (1979). Studies on two types of gonadotropins from both salmon and carp pituitaries. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **38**: 421-440.
- Idler, D. R. and Ng, T. B. (1980). Pituitary gonadotropins of bony fish. Isolation and biological action. *Proc.—Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insemin.*, **9**(2): 339-345.
- Idler, D. R. and Ng, T. B. (1983). Teleost gonadotropins: isolation, biochemistry and function. *Fish Physiology*, Vol. IXA, Academic press, pp. 187-221.
- Idler, D. R., Hwang, S. J. and Bazar, L. S. (1975a). Fish gonadotropin(s). I. Bioassay of salmon gonadotropin(s) *in vitro* with immature trout gonads. *Endocr. Res. Commun.*, **2**(3): 199-213.
- Idler, D. R., Bazar, L. S. and Hwang, S. J. (1975b). Fish gonadotropin(s). II. Isolation of gonadotropin(s) from chum salmon pituitary glands using affinity chromatography. *Endocr. Res. Commun.*, **2**(3): 215-235.
- Idler, D. R., Bazar, L. S. and Hwang, S. J. (1975c). Fish gonadotropin(s). III. Evidence for more than one gonadotropin in chum salmon pituitary glands. *Endocr. Res. Commun.*, **2**(3): 237-249.
- Jalabert, B., Goetz, F. W., Breton, B., Fostier, A. and Donaldson, E. M. (1978). Precocious induction of oocyte maturation and ovulation in coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *J. Fish. Res. Board Can.*, **35**: 1425-1429.
- Kagawa, H., Young, G. and Nagahama, Y. (1982). Estradiol-17 $\beta$  production in isolated Amago Salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) ovarian follicles and its stimulation by gonadotropins. *Gen. Comp. Endocrinol.* **47**: 361-365.
- Kagawa, H., Young, G., Adachi, S. and Nagahama, Y. (1982). Estradiol-17 $\beta$  production in amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) ovarian follicles: Role of the thecal and granulosa cells. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **47**: 440-448.
- Kime, D. E. and Dolben, I. P. (1985). Hormonal changes during induced ovulation of the carp, *Cyprinus carpio*, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **58**: 137-149.
- Kime, D. E. and Hyder, M. (1983). The effect of temperature and gonadotropin on testicular steroidogenesis in *Sarotherodon* (*Tilapia*) *mossambicus in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **50**: 105-115.
- Kobayashi, M., Aida, K. and Hanyu, I. (1985). Radioimmunoassay for silver carp gonadotropin. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **51**(7): 1085-1091.
- Kobayashi, M., Aida, K., Hanyu, I. and Ishii, S. (1985). Application of radioreceptor assay to the purification of silver carp gonadotropin. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **51**(3): 405-411.
- Lam, T. J., Pandey, S., Nagahama, Y. and Hoar, W. S. (1978). Endocrine control of oogenesis, ovulation and oviposition in goldfish. In "Comparative Endocrinology" (P. J. Gaillard and H. H. Boer, eds.), pp. 55-64. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Leloup-Hatey, J., Oudinet, J. P. and Lopez, E. (1981). Testicular steroidogenesis during gonadotropic induced spermatogenesis in male European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Abstr. Pap. Int. Sym. Comp. Endocrinol.*, **9th**, 1981 p. 36.
- Lo, T.-B., Huang, F.-L., Chang, Y.-S., Huang, C.-J. and Chang, G.-D. (1981). Study

- on gonadotropins from the pituitary gland of pike eel (*Muralnesox cinereus*). *Abstr. Pap. Int. Symp. Comp. Endocrinol.*, 9th, 1981 p. 3.
- Lupo, C. and Chieffi, G. (1963). Oestrogens and progesterone in ovaries of the marine teleost. *Conger conger*. *Nature (London)* **197**: 596.
- Mukherjee, D. and Bhattacharya, S. (1981). A sensitive and easy bioassay for teleost gonadotropin depending on the ovarian-free cholesterol depletion *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **45**: 249-255.
- Nagahama, Y. (1983). The functional morphology of teleost gonads. *Fish Physiology*. Vol. IXA Academic press. pp. 223-275.
- Nagahama, Y., Kagawa, H. and Young, G. (1982). Cellular sources of sex steroids in teleost gonads. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **39**: 56-64.
- Ng, T. B. and Idler, D. R. (1978). "Big" and "little" forms of plaice vitellogenic and maturational hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **34**: 408-420.
- Ng, T. B. and Idler, D. R. (1979). Studies on two types of gonadotropins from both American plaice and winter flounder pituitaries. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **38**: 410-420.
- Ng, T. B. and Idler, D. R. (1980). Gonadotropic regulation of androgen production in flounder and salmonids. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **42**: 25-38.
- Ng, T. B., Idler, D. R., and Burton, M. P. (1980). Effects of teleost gonadotropins and their antibodies on gonadal histology in winter flounder. *Gen. Comp. Endocrinol.* **42**: 355-364.
- Norman, J. R. and Greenwood, P. H. (1931). A history of fishes, 3rd Ed., Butler and Tanner Ltd., Great Britain, p. 268.
- Norris, D. O. (1985). *Vertebrate Endocrinology*, ed. Norris, D. O. Lea and Febiger Ltd. p. 263.
- Otsuka, S. (1956). On the extraction and bioassay of the follicle stimulating and luteinizing substances of the salmon. *Endocrinol. Jpn.*, **3**: 272-277.
- Pierce, J. G., Faith, M. R. and Donaldson, E. M. (1976). Antibodies to reduced S-carboxymethylated alpha subunit of bovine luteinizing hormone and their application to study of the purification of gonadotropin from salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) pituitary glands. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **30**: 47-60.
- Sanchez-Rodriguez, M., Escaffre, A. M., Marlot, S. and Reinaud, P. (1978). The spermiation period in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Plasma gonadotropin and androgen levels, sperm production and biochemical changes in the seminal fluid. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, **18**: 943-948.
- Sinha, V. R. P. (1971). Induced spawning with fractionated fish pituitary extract. *J. Fish. Biol.*, **3**: 263-272.
- Stockell Hartree, A. (1966). Separation and partial purification of the protein hormones from human pituitary glands. *Biochem. J.*, **100**: 754-761.
- Sundararaj, B. I. and Goswami, S. V. (1966). Effects of mammalian hypophyseal hormones, placental gonadotropins, gonadal hormones and adrenal corticosteroids on ovulation and spawning in hypophysectomized catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), *J. Exp. Biol.*, **161**: 287-296.
- Sundararaj, B. I. and Nayyar, S. K. (1976). Effects of carp gonadotropin on ovarian maintenance, maturation and ovulation in hypophysectomized catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **30**: 472-476.

- Sundararaj, B. I. and Samy, T. S. A. (1974). Some aspects of chemistry and biology of piscine gonadotropins. *In* "Gonadotropins and Gonadal Functions" (N. R. Moudgal, ed.), pp. 118-127. Academic Press, New York.
- Sundararaj, B. I., Anand, T. C. and Donaldson, E. M. (1972a). Effects of partially purified salmon pituitary gonadotropin on ovarian maintenance, ovulation and vitellogenesis (Bloch). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **18**: 102-114.
- Sundararaj, B. I., Anand, T. C. and Sinha, V. R. P. (1972b). Effects of carp pituitary fractions on vitellogenesis, ovarian maintenance and ovulation in hypophysectomized catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *J. Endocrinol.*, **54**: 87-98.
- Sundararaj, B. I., Goswami, S. V. and Donaldson, E. M. (1972c). Effect of salmon gonadotropin on *in vitro* maturation of oocytes of a catfish *Heteropneustes fossilis*. *J. Fish. Res. Board Can.*, **29**: 435-437.
- Sundararaj, B. I., Nayyar, S. K., Anand, T. C. and Donaldson, E. M. (1971). Effects of salmon pituitary gonadotropin, ovine luteinizing hormone and testosterone on the testes and seminal vesicles of hypophysectomized catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **71**: 73-83.
- Upadhyay, S. N. (1977). Morphologie des gonades immatures et étude expérimentale des l'induction de la gamétogénèse chez la Truite arc-en-ciel juvenile (*Salmo gairdneri* R.). Thèse Doct., Sci. Univ. Paris VI, France.
- Yamazaki, F. and Donaldson, E. M. (1968). The spermiation of goldfish (*Carassius auratus*) as a bioassay for salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) gonadotropin. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **10**: 383-391.
- Yamazaki, F. and Donaldson, E. M. (1969). Involvement of gonadotropin and steroid hormones in the spermiation of the goldfish (*Carassius auratus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **12**: 491-497.
- Yaron, Z. and Barton, C. (1980). Stimulation of estradiol-17 $\beta$  output from isolated ovarian fragments of the plaice (*Pleuronectes platessa*) by homologous pituitary extract. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **42**: 151-154.
- Yoneda, T. and Yamazaki, F. (1976). Purification of gonadotropin from chum salmon pituitary glands. *Bull. Jpn. Soc. Fish.*, **42**: 343-350.
- 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.* (in press).
- Yu, J. Y.-L. and Lin, T. M. (1985). Gonadotropin specificity of *in vitro* androgen formation by gonads from various pisces, 10th Int. Symp. Comp. Endocr. July 22-26, 1985, Colorado, U. S. A. (Abstract).
- Yu, J. Y.-L. and Lin, T.-M. (1986). Species variation of gonadotropic activity in an *in vitro* assay measuring androgen formation by carp (*Cyprinus carpio*) testis with special reference to bioassay of piscine gonadotropins. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **62**: 428-436.
- Yu, J. Y.-L., Chang, T. Y., Hsu, H.-K., Liao, C.-F. and Wan, W. C.-M. (1981a). Androgen/testosterone synthesis by the dissociated testicular cells from mice of different ages in response to rat LH stimulation *in vitro*. *Bull. Inst. Zool., Academia Sinica.*, **20**(1): 57-65.

- Yu, J. Y.-L., Dicknoff, W. W., Swanson, P. and Gorbman, A. (1981b). Vitellogenesis and its hormonal regulation in the Pacific hagfish *Eptatretus stouti* L. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **43**: 492-502.
- Yu, J. Y.-L. and Wand, L.-M. (1983). A sensitive bioassay of luteinizing hormones from various vertebrate species: androgen production by rooster testis *in vitro*. *Bull. Inst. Zool., Academia Sinica* **22**(1): 57-65.
- Yu, J. Y.-L. and Wang, L. M. (1984). Comparisons of androgen formation activities of vertebrate gonadotropins by *in vitro* rooster testis system. *J. Steroid Biochem.* Vol. 20 No. 6 B. June 1984.
- Yu, J. Y.-L., and Wang, L.-M. (1987). Comparative effects of diverse vertebrate gonadotropins on androgen formation *in vitro* testes of roosters and mice. *Biol. Reprod.*, **36**: 816-824.
- Yu, J. Y.-L., Wang, L.-M. and Fei, M.-L. (1984). Comparative effects of mammalian gonadotropins on androgen formation *in vitro* from mouse testis interstitial cells. *Bull. Inst. Zool., Academia Sinica*, **23**(1): 81-91.

Proceedings of the Symposium on "Fish Reproduction and Its Endocrine Control: Basic and Practical Aspects", Sponsored by Institute of Zoology, Academia Sinica, and Department of Fisheries, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei, Taiwan, R. O. C. June 19-20, 1987, pp. 1-37

## Purification, Biochemical Properties, Physiological Functions and Bioassays of Piscine Gonadotropins

J. Yuh-Lin Yu and I. Chieh-Hwa Chou

*Endocrinology Laboratory  
Institute of Zoology, Academia Sinica  
Nankang, Taipei, Taiwan, R. O. C.*

This article introduces the purification, structure, function and bioassay of piscine gonadotropins, with particular emphasis on information obtained from our laboratory.

Most studies indicate that a single gonadotropin exists in pisces. However, two types of piscine gonadotropins were recently identified: one is "maturational gonadotropin", the other is "vitellogenic gonadotropin". The maturational gonadotropin is more comparable to mammalian luteinizing hormone in its biological activity, while vitellogenic gonadotropin is not comparable to mammalian follicle stimulating hormone. Nevertheless, piscine gonadotropins, like luteinizing hormone and follicle stimulating hormone from all higher vertebrate species, comprise A and B subunits. The amino acid composition of piscine gonadotropin also resembles, to a certain degree, to mammalian luteinizing hormone and follicle stimulating hormone.

Hypophysical gonadotropin regulates the growth and function of gonads from both sexes, such as spermatogenesis, ovulation, and steroidogenesis. Based on the principles of such physiological functions, various biological methods were developed to assay the purity and biological activity of gonadotropins. This article outlines the principles and methods of nearly 10 such bioassays of both *in vivo* and *in vitro* systems, such as testicular and ovarian steroidogenesis, oocyte maturation, cyclic AMP formation by gonads, etc. Both piscine species and other vertebrate species may be employed as test animals, with the former species being more responsive. Particular emphasis was placed on the *in vitro* bioassays of piscine gonadotropins using *in vitro* androgen production system by testes from common carp and roosters developed in our laboratory.

Our work on the purification and isolation of gonadotropins from common carp and silver carp pituitaries as well as on the development of antiserum against the silver carp gonadotropin are also included. Such antiserum is useful for radio-immunoassay of gonadotropins from phylogenetically closer piscine species.