

高原鼠兔季节性繁殖中的神经内分泌调控

II. 不同光制对生殖恢复期的影响

李子巍* 杜继曾** 孙儒泳

(北京师范大学生物学系, 北京, 100875)

摘 要

本研究将野外捕获的成年雄性高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 分 3 组进行不同光制的饲养, 以检验光周期对其神经内分泌——生殖轴功能的影响: (1) 长光照组睾丸及附属性腺的重量和血浆睾酮水平均明显高于自然光组 ($p < 0.05$) 和短光照组 ($p < 0.01$)。 (2) 长光照组的松果腺重量 (1.5 ± 0.1 毫克, $n=15$) 和褪黑激素含量 (89.7 ± 5.8 微微克/松果腺), 均显著低于其它两组。 (3) 自然光组和短光照组性腺的显著萌发表明, 在高原鼠兔季节性繁殖的年周期中, 其神经内分泌——生殖轴对春分前短光照的抑制作用具有不应期。

关键词 高原鼠兔; 光周期; 性腺; 睾酮; 褪黑激素

温带地区生活的哺乳动物, 其繁殖呈季节性, 而光周期是决定动物季节性繁殖最重要的环境因素。环境光变化的信息, 通过松果腺的主要产物——褪黑激素 (Melatonin, MLT) 的相应变化, 对神经内分泌——性腺轴 (Neuroendocrine-gonadal axis) 进行调控, 以保证哺乳动物幼仔在每年中的最适时期出生和种群延续 (Steger 等, 1985)。

关于光周期如何通过神经内分泌系统调节哺乳动物季节性繁殖及其机制的研究, 一直引起人们的关注。人们曾先后对许多动物进行过研究, 如: 啮齿类 (Lynch 等, 1977)、食肉类 (Forsberg 等, 1989)、偶蹄类 (Asher 等, 1988)、食虫类 (Fowler 等, 1988)、灵长类 (Wilson 等, 1989) 和有袋类 (Williamson 等, 1990)。哺乳动物季节性繁殖的神经内分泌调控机制, 是目前国际上的热门课题之一。其研究逐渐由整体水平、器官水平, 深入到分子水平, 而这类研究在我国则刚刚起步。

高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 是青藏高原特有食草类小型哺乳动物。繁殖力强, 寿命短 (王学高等, 1989, 1991), 种群数量高, 是草原害鼠。探讨光周期在该动物季节性繁殖中的作用与调控机制, 尚属空白领域的研究, 也可为将该动物培养驯化成新型的实验动物提供理论依据。

材料与方 法

1991 年 1 月下旬, 在青海省贵南县 (北纬 $35^{\circ}30'$, 东经 $100^{\circ}35'$, 海拔 3 200 米) 捕获高原鼠兔, 运至西宁市中国科学院西北高原生物研究所。选健康成年雄鼠兔, 饲喂颗

国家自然科学基金、中国科学院海北高寒草甸生态系统定位站基金和国家教委博士点基金资助项目。本项研究中褪黑激素的测定由北京市中关村地区联合分析测试中心资助。

* 现在工作单位: 北京大学生物学系生理教研室, 北京, 100871

** 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁, 810001

本文于 1993 年 2 月 16 日收到, 1993 年 12 月 27 日收到修改稿

— 154 —

粒兔饲料,并适量添加胡萝卜和卷心菜。

动物分组:1月30日,将鼠兔随机分为3组,各在一房间内单笼饲养。长光照组(LP,16L:8D,灯亮时间为04:00小时)和短光照组(SP,8L:16D,灯亮时间为08:00小时)均以4支40瓦荧光灯为光源,笼处照度为350—450lux。自然光组(NL)则以窗户采自然光照明,中午笼处照度为200—1000lux。用自动控制器(上海电钟厂)控制鼠兔饲养房间灯光的启闭。室温用控温仪(上海医用仪表厂)接电炉控制在 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。将鼠兔饲喂至3月21日(春分)结束。

采样方法:实验结束时,于夜间(22:00—24:00小时)对动物进行采样。红灯下(10—20lux)断头采血,离心管置冰浴中收集血液,肝素钠抗血凝。迅速摘出松果腺,用电子分析天平(Precisa 125A)称重,并放入小塑料离心管,投入液氮。与血浆一起在 -20°C 冰箱中贮存待测。随后,从动物尸体中剥离出睾丸、附睾、输精管和精囊腺,分别称重,并做附睾涂片。

激素检测:血浆睾酮检测用放射免疫法。药盒购于上海市内分泌研究所。以二氯甲烷提取血浆睾酮,用液闪谱仪(Packard 2250CA)进行闪烁计数。样品回收率为 $96.93\pm 2.5\%$ ($n=24$)。松果腺褪黑激素检测采用Wakabayashi等(1986)介绍的方法。用超声波破碎仪(Sonics and Materials INC.)破碎松果腺。微孔滤膜过滤后,用高效液相色谱仪(Varian 5000)-荧光检测器(Shimadzu RF530)检测。荧光检测器 $\lambda_{\text{ex}}=285\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=345\text{nm}$ 。色谱柱子为ODS反相柱(25cm \times 4.6mm I. D. $5\mu\text{m}$, Regis),柱温 38°C 。流动相为0.01M醋酸缓冲液与甲醇的混合液组成(65:35),流速为2.0毫升/分;MLT保留时间为11分。样品回收率为 $96.2\pm 3.2\%$,变异系数(CV)为3.3%。

结 果

1. 体重和性腺重量

在对高原鼠兔的此项研究中,饲养7星期后,三种光照组之间动物的体重无明显差异($p>0.05$)。长光照组、自然光照组和短光照组的平均体重分别为: 159.7 ± 5.6 克($n=15$)、 158.4 ± 4.7 克($n=16$)和 158.4 ± 4.7 克($n=17$)。

与自然光照组相比较,长光照组具有较重的睾丸(932.3 ± 79.3 毫克/对/100克体重, $n=15$)、附睾(171.1 ± 13.8 毫克/对/100克体重, $n=15$)、输精管(7.9 ± 0.5 毫克/对/100克体重, $n=15$)和精囊腺(47.7 ± 5.3 毫克/对/100克体重, $n=15$),其差异显著性水平分别为: $p<0.005$ 、 $P<0.001$ 、 $P<0.001$ 和 $P<0.001$ 。当长光照组与短光照组相比较时,这种差异更加显著(图1)。

2. 血浆睾酮水平

三种光照条件下高原鼠兔血浆睾酮水平,随饲养组白昼的延长而升高(图2)。长光照组鼠兔血浆睾酮水平(1537.4 ± 143.5 微微克/毫升, $n=15$),明显高于自然光照组(差异显著性水平为 $P<0.05$)和短光照组(差异显著性水平 $P<0.001$),而后二者之间差异不显著($t=2.007$, $P>0.1$)。

3. 松果腺重与褪黑激素含量

长光照组鼠兔松果腺(1.5 ± 0.1 毫克, $n=15$),明显轻于其它两光照组(差异显著性水平均为 $P<0.01$)。而自然光照组和短光照组相比较,松果腺重量无明显差异(图2)。

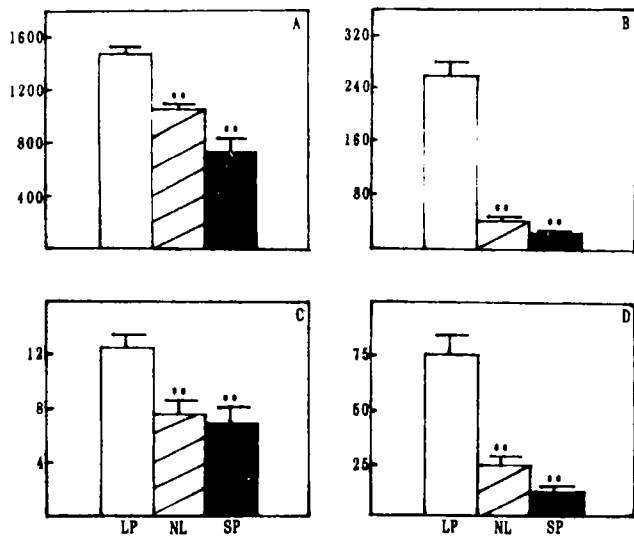


图1 光周期对雄性高原鼠兔性腺重量的影响

Fig.1 Effects of different photoperiods on the gonadal weight in adult male plateau pikas

注：柱高示均数，柱上方竖线示标准误，每组15—17只动物。每付睾丸及其附属性腺重量均以毫克/100克体重为单位。A：睾丸；B：附睾；C：输精管；D：精囊腺；LP：长光照组；NL：自然光照组；SP：短光照组。* *：p<0.01，与长光照组差异显著性比较。

Note: Each column represents the mean of 15—17 animals, vertical line on the top of the column signifies standard errors. The unit of the gonadal weight showed in mg/100g body Wt. . A: Weight of paired testes; B: Weight of paired epididymises; C: Weight of paired deferent ducts; D: Weight of paired seminal vesicle; LP: Long photoperiod group; NL: Natural light group; SP: Short photoperiod group. * * : p<0.01, comparison with long photoperiod group was significance of difference.

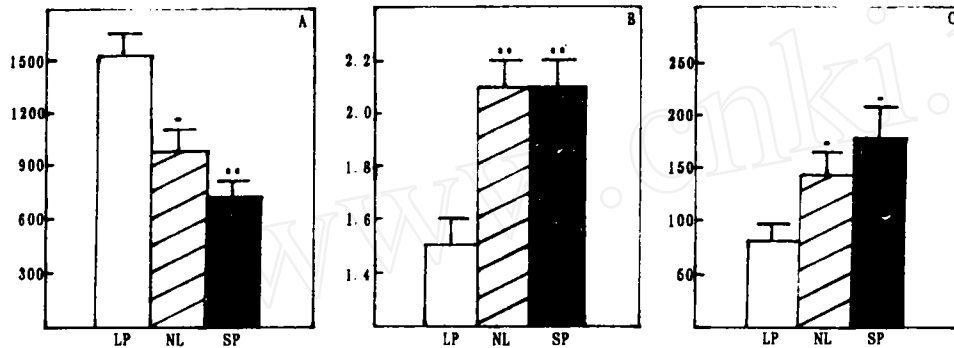


图2 光周期对雄性高原鼠兔血浆睾酮水平、松果腺重量和褪黑激素含量的影响

Fig.2 Effects of photoperiods on plasma testosterone level, pineal mass and pineal melatonin content in adult male plateau pikas

注：柱高示均数，柱上方竖线示标准误，每组6—17只动物。A：血浆睾酮水平（微微克/毫升）；B：松果腺重（毫克）；C：松果腺褪黑激素含量（微微克/松果腺）；LP：长光照组；NL：自然光照组；SP：短光照组。*：p<0.05，* *：p<0.01，与长光照组差异显著性比较。

Note: Each column represents the mean of 6—17 animals, vertical line on the top of the column signify standard errors. A: Plasma testosterone (pg/ml); B: Pineal mass (mg); C: Pineal melatonin content (pg/pineal gland); LP: Long photoperiod group; NL: Natural light group; SP: Short photoperiod group. * : p<0.05, * * : p<0.01, comparison with long photoperiod group was significance of difference.

在三种光照条件下，高原鼠兔松果腺 MLT 含量随光照时间的增加而明显降低(图2)。与其它两光照组相比较，长光照组鼠兔松果腺 MLT 含量受光抑制作用影响最明显 (P<

0.05), 而自然光照组和短光照组之间, MLT 含量差异不显著 ($t=0.890, p>0.2$)。

讨 论

高原鼠兔在三种光照条件下呈现相似的体重, 这与金地鼠 (*Mesocricetus auratus*) (Champney, 1989)、田鼠 (*Microtus ochrogaster*) (Nelson 等, 1989) 等动物的相应反应一致。

与短日照动物明显不同 (Hastings 等, 1985), 成年雄性高原鼠兔在长光照条件饲养后, 其睾丸及其附属性腺明显增重, 此结果类似于长日照哺乳动物, 如: 金地鼠 (Reiter 等, 1983)、黑线毛足鼠 (*Phodopus sungorus*) (Yellon 等, 1989) 和田鼠 (Nelson 等, 1989) 等。值得注意的是, 在光照时间短于 12 小时的条件下 (自然光照组和短光照组), 高原鼠兔并未呈现睾丸及其附属性腺受抑制、重量减轻的现象 (Reiter 等, 1983; Hastings 等, 1985)。与 2 月初开始分组时动物性腺状况 (睾丸重: 68.4 ± 3.9 毫克/对/100 克体重; 附睾重: 14.4 ± 1.4 毫克/对/100 克体重; 输精管重: 1.8 ± 0.1 毫克/对/100 克体重; 精囊腺重: 1.8 ± 0.4 毫克/对/100 克体重; $n=36$ 只动物) 相比较, 短光照组也出现睾丸 ($p<0.01$) 和输精管 ($p<0.001$) 明显萌发, 并在附睾涂片中可见大量成熟的精子。

产生以上现象的原因可能有二个。一是与动物饲养房的温度较高有关。2—3 月, 高原鼠兔栖息地的生态环境温度为 $-6.9-0.2^{\circ}\text{C}$ (2 月和 3 月每月地面平均温度和每月 20 厘米深平均地温的综合结果), 这远低于动物饲养房间的温度 ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$)。有文献报道, 环境温度升高, 能明显促进某些动物睾丸及附属性器官的发育 (Nelson 等, 1989; Pevet 等, 1989)。但是, 在鼠兔的性休止期, 栖息地温度 ($-10.6-11.8^{\circ}\text{C}$, 9—12 月) 同样明显低于鼠兔饲养房的温度, 而短光的抑制作用却十分明显 (作者将另文报道)。这说明环境温度对鼠兔生殖功能的作用是次要的。

另一个可能的原因是与高原鼠兔自身季节性繁殖的调控机制有关。Matt 和 Stetson (转引自 Stetson 等, 1981) 研究发现, 处于生殖恢复期的金地鼠的生殖功能, 完全不受环境光周期的影响 (即使在无光的条件下), 生殖内分泌状况均能内源性恢复至与长光照一样的水平。进一步研究表明, 处于长光照条件下的金地鼠, 体内被注入 MLT (或转入短光照条件) 可引起性腺器官的萎缩。21 周以后, 这些动物对 MLT (或短光照) 的抑制麻木 (不应), 性腺自发萌发。只有通过长光照才能打断不应期, 靶组织重新建立对松果腺 MLT 的敏感性 (Reiter 等, 1983, 1990)。在自然界中, 这种机制不仅使仓鼠在秋分以后不利的生态环境中停止繁殖, 而且可以保证它们在春季终止冬眠时立刻有能力交配产仔。与金地鼠不同, 高原鼠兔是非冬眠动物, 在冬季里每日仍然进行洞外摄食、日光浴、观望、挖掘、追逐和群体交往等活动, 它可能会直接感受环境光周期每日和季节性的变化。本项研究表明, 在高原鼠兔的生殖恢复期, 同样存在有不应期。本项实验开始于 1 月末, 此时, 在野外捕获的高原鼠兔已经历了 3 个多月的生殖抑制期 (上年 6 月上旬—8 月下旬) 和 5 个月的性休止期 (上年 9 月上旬—1 月下旬), 同时包括 4 个多月的短光照 (上年 9 月下旬—1 月末)。因此, 在生殖恢复期的短光照条件下, 高原鼠兔呈现性腺器官的明显萌发, 并完全具备生殖能力。

与短光照组不同, 长光照组促进鼠兔性腺器官的发育, 可能是由长光照打断了不应期, 在抑制鼠兔松果腺 MLT 合成的同时 (图 2), 使松果腺对生殖内分泌轴的抑制作用减弱, 从而促进鼠兔性腺器官的萌发 (图 1) 和血浆睾酮浓度水平的升高 (图 2)。因此,

由于长光照和短光照对鼠兔神经内分泌——生殖轴的作用机制不同，故二光照组鼠兔的效应程度也不同。

在本项研究中，光照时间少于 12 小时的条件（自然光照组和短光照组）饲养的鼠兔，具有较重的松果腺，这与大鼠（葛仁勇，1985）和黑线毛足鼠（Pevet，1983）等动物的相应反应是一致的。而光周期对鼠兔松果腺 MLT 影响的结果表明：高原鼠兔的松果腺，不仅能感知环境光周期的变化，而且能成功地将该信息传递至下丘脑-垂体-性腺轴。

根据“长日照动物（long-day animals）”和“短日照动物（short-day animals）”的划分方法（转引自 Tamarkin 等，1985），检验高原鼠兔的光敏感类型。（1）分布与生境：高原鼠兔属青藏高原特有种。它们广泛栖息于海拔 3 200—5 200 米的草原（郑昌琳，1989），该地区平均气温为 $-1.3-1.2^{\circ}\text{C}$ ，日照百分率达 60%（王祖望等，1980），属典型大陆性高原气候。（2）繁殖：通常一年繁殖 1—2 次，于当年 4—7 月（或 3—9 月）进行，妊娠期短（22 天），每胎产仔 1—8 只（王学高等，1991）。（3）光敏感性：在不同的光周期条件下，该动物的松果腺 MLT、血浆睾酮以及性腺重量，均呈现明显的应答（本项研究）。因此，高原鼠兔可划分为长日照动物。

参 考 文 献

- 王学高，戴克华. 1989. 高原鼠兔 *Ochotona curzoniae* 自然寿命的研究. 兽类学报, 9 (1) : 56—62.
- 王学高，戴克华. 1991. 高原鼠兔种群繁殖生态的研究. 动物学研究, 12 (2) : 155—161.
- 王祖望，曾绪祥，韩永才，张晓爱. 1980. 高山草甸生态系一小哺乳动物能量动态的研究 I. 高原鼠兔和中华鼯鼠对天然食物的消化率和同化水平的测定. 动物学报, 26 (2) : 184—194.
- 郑昌琳. 1989. 鼠兔科. 见：中国科学院西北高原生物研究所编. 青海经济动物志. 西宁：青海人民出版社，716—717.
- 葛仁勇. 1985. 光照及 24 小时节律对大鼠松果腺中前列腺素含量的影响. 科学通报, 9 : 703—705.
- Asher G W, Barrell G K, Adam J L, Staples L D. 1988. Effects of subcutaneous melatonin implants on reproductive seasonality of farmed fallow deer (*Dama dama*). *J Reprod Fert*, 84 : 679—691.
- Champney T H. 1989. β -Adrenergic blockers prevent short Photoperiodinduced gonadal regression, but not melatonin induced regression in male Syrian hamsters. *J Exp Zool*, 249 : 221—228.
- Forsberg M, Fougner J A, Hofmo P O, Madej M, Einarsson E J. 1989. Photoperiodic regulation of reproduction in the male silver fox (*Vulpes vulpes*). *J Reprod Fert*, 87 : 115—123.
- Fowler P A. 1988. Seasonal endocrine cycles in the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*. *J Reprod Fert*, 84 : 259—272.
- Hastings M H, Herbert J, Martensz N D, Riberts A C. 1985. Annual reproductive rhythms in mammals: mechanisms of light synchronization. *Ann NY Acad Sci* 453 : 182—204.
- Lynch G R, Epstein A L. 1977. Melatonin induced changes in gonads, pelage and thermogenic characters in the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*. *Comp Biochem Physiol*, 53c : 67—68.
- Nelson R J, Frank D, Smale L, Willoughby S B. 1989. photoperiod and temperature affect reproductive and nonreproductive functions in male prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Biol Reprod*, 40 : 481—485.
- Pevet P. 1983. Anatomy of the pineal gland of mammals. In: Relkin R. editor. The pineal gland. New York: Elsevier Science Press, 151—199.
- Pevet P, Vivien-Roels B, Masson-Pevet M. 1989. Low temperature in the golden hamster accelerates the gonadal atrophy induced by short photoperiod but does not affect the daily pattern of melatonin secretion. *J Neural Transm*, 76 : 119—128.
- Reiter R J, Richardson B A, King T S. 1983. The pineal gland and its indole products: their importance in the control of reproduction in mammals. In: Relkin R. editor. The pineal gland. New York: Elsevier science press 151—199.
- Reiter R J. 1990. 哺乳动物松果腺：其生物合成能力和生理意义. 生理科学进展, 21 (1) : 18—21.
- Steger R W, Matt K, Bartke A. 1985. Neuroendocrine regulation of seasonal reproductive activity in the male Golden

- hamster. *Neuroscience & Biobehavioral Rev*, 9: 191—201.
- Stetson M H, Tate-Ostroff B. 1981. Hormonal regulation of the annual reproductive cycle of Golden hamsters. *General & comp Endoc*, 45: 329—344.
- Tamarkin L, Baird C T, Almeida O F X. 1985. Melatonin; a coordination signal for mammalian reproduction? *Science*, 227: 714—720.
- Wakabayashi H, Shimada K. 1986 Variation of melatonin and serotonin content in rat pineal gland With sex and oestrous phase difference determined by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J Chromatography*, 381: 21—28.
- Williamson P, Fletcher T P, Renfree M B. 1990. Testicular development and maturation of the hypothalamic-pituitary-testicular axis in the male tammar, *Macropus eugenii*. *J Reprod Fert*, 88: 549—557.
- Wilson M E, Gordon T P. 1989. Short-day melatonin pattern advances puberty in seasonally breeding rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *J Reprod Fert*, 86: 435—444.
- Yellon S M, Goldman B D. 1989. Photoperiod control of reproductive development in the male Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology*, 114: 664—670.

NEUROENDOCRINE REGULATION OF SEASONAL BREEDING ACTIVITY IN PLATEAU PIKA Ⅱ. THE INFLUENCE OF PHOTOPERIOD DURING THE RESTORATION PHASE

LI Ziwei DU Jizeng* SUN Ruyong

(Department of Biology, Beijing Normal University, Beijing, 100875)

Abstract

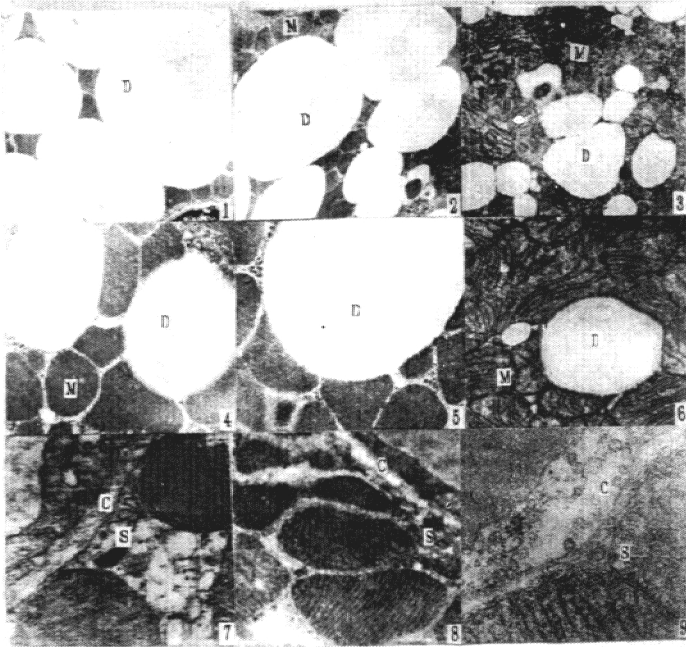
The present experiment was performed in order to study whether photoperiods affect the body weight, gonadal weight, plasma testosterone concentration and pineal melatonin content in male plateau pika (*Ochotona curzoniae*) during their restoration phase. The main results are as follows:

(1) The weights of testes (932.3 ± 79.3 mg/pair/100gBW, $n=15$), epididymis (171.1 ± 13.8 mg/pair/100gBW, $n=15$), deferent duct (7.9 ± 0.5 mg/pair/100gBW, $n=15$) and seminal vesicle (47.7 ± 5.3 mg/100gBW, $n=15$) of the long photoperiod group were higher than that of the short photoperiod group and the natural light group. (2) Plasma testosterone ($p < 0.001$) concentration (1537.4 ± 143.5 pg/ml, $n=15$) of the long photoperiod group was still higher than that of the other two groups. (3) The weight of pineal gland (1.5 ± 0.1 mg, $n=15$) and the content of melatonin (89.7 ± 5.8 pg/pineal gland, $n=6$) of long photoperiod group were lower than that of the other two groups.

The results suggested that the change of neuroendocrine-gonad axis to the outside of photoperiod has sensitivity. Therefore it may be infer utilization the change of photoperiod to plateau pika in the ecological environment could be regulate the seasonal breeding.

Key words Plateau pika (*Ochotona curzoniae*); Photoperiod; Gonads; Testosterone; Melatonin

* Northwest Plateau Institute of Biology, Academia Sinica



1—3 褐色脂肪细胞脂滴 (D) 的变化 × 6000
 1—3 Showing the variations of fat droplets (D) of brown adipose cells, × 6000;
 4—6 褐色脂肪细胞线粒体 (M) 和嵴的变化 × 12000
 4—6 Showing the variations of mitochondria (M) and cristae of brown adipose cells, × 12000;
 7—9 褐色脂肪组织毛细血管 (C) 的变化, (S) 示吞饮小泡 × 25000
 7—9 Showing the variations of capillary (C) of brown adipose tissues. (S) showing the swallowing droplets. × 25000.
 1、4、7 示冬眠前; 2、5、8 冬眠; 3、6、9 冬眠后
 1、4、7 Photo are prehibernation; 2、5、8 hibernation; 3、6、9 posthibernation.

www.cnki.net