

梅花鹿生茸区骨膜睾酮 特异结合的测定

李春义 邵国良 张学文 赵世臻
(中国农业科学院特产研究所)

邹继超 范植明
(中国科学院动物研究所)

摘 要

为阐明睾酮在鹿角柄发生过程中的作用机理, 本文对6头梅花鹿的生茸区骨膜和头部的非生茸区骨膜的睾酮特异结合进行了测定。所得结果为, 正常、去势雄仔鹿的生茸区骨膜中都存在一定量的睾酮特异结合(分别为: 正常, 细胞质为29.32, 细胞核为169.63; 去势, 细胞核为595.84。单位: fmol/mg蛋白), 而非生茸区骨膜却未测到这种特异结合; 雌鹿的测定结果为, 除去势雌仔鹿生茸区骨膜具有一定量的睾酮特异结合(细胞核为223.21fmol/mg蛋白)外, 其余生茸区和非生茸区均不存在睾酮特异结合。这些结果表明, 雄仔鹿和去势雌仔鹿生茸区骨膜中可能存在着一定量的雄激素受体, 这种骨膜在特定的生理条件下受睾酮的直接作用, 是睾酮的靶组织。

关键词 生茸区, 骨膜, 睾酮, 特异结合, 受体

前 言

雄性鹿科动物的茸角每年从角柄上脱落和再生。现已证明, 鹿额骨生茸区骨膜是角柄发生的组织基础(Hartwig等^[1])。生茸区骨膜诱发角柄的过程, 必须在适宜的刺激下才能完成。如将生茸前的雄鹿去势, 该鹿将不能再发生角柄和鹿茸, 但给以适量的外源睾酮, 可使生茸区骨膜重新获得诱发角柄的能力, 然后可导致鹿茸的生长(Jacze-wski等^[2])。另外, 对去势的雌鹿给予适量的外源睾酮, 也能诱导雌鹿发生角柄和鹿茸(Wislocki等^[3]), 这说明雌鹿也具有生长角柄和鹿茸的潜力, 而且睾酮是诱发鹿发生角柄和鹿茸的必要条件。对于睾酮在这一过程中的作用机理曾有一些推论, 如Bubenik, G.^[4]曾认为, 角柄只有在生茸区骨膜与位于中枢神经系统中的生茸中枢建立起神经联系后才能发生, 雄激素就是建立这种联系的必要条件。雄激素可能作用于生茸区骨膜, 或作用生茸中枢, 也可能对两者都起作用; Fennessy等^[5]提出, 角柄的发生是由于睾酮对生茸区骨膜的直接作用, 在这种骨膜中可能存在着睾酮受体。但这些推论尚缺乏实验证据。为此本实验以梅花鹿为材料, 对雌、雄鹿生茸骨膜的睾酮特异结合进行了测定, 以期阐明睾酮与生茸区骨膜的关系以及雌鹿在外源激素刺激下能够生茸的原因。

* 本文于1988年7月16日收稿。

材 料 和 方 法

一、动物 6头东北梅花鹿,其中2头雄仔鹿,2头雌仔鹿,均为1986年6月出生;1头成年雌鹿;1头怀孕雌鹿。于1987年3月10日(角柄约4月上、中旬发生)将其中一雄、一雌仔鹿去势。

二、组织取样 4月10日将鹿杀死,取下鹿头及去势雄鹿的部分小肠,将每个鹿头两侧角柄发生中心部位——额部眶上突的骨膜取下,并用头部鼻骨、上颌骨与泪骨交界处的骨膜作为对照。以上组织冻存于-30℃冰箱中备用。

三、主要试剂和仪器 ^3H -睾酮 76ci/mmol,上海原子核研究所产品;睾酮, E. Merk产品;二巯基赤藓醇(DTT), Serva产品;葡聚糖T-70, Pharmacia产品; FS-I型高速分散器,江苏金坛环保仪器厂产品,液闪仪为美国 Beckman 9800型。

四、特异结合测定 采用邹继超^[6]报道的方法。首先将低温冻存的组织化冻、称重、剪碎,加入10mM Tris-盐酸缓冲液,(内含1.5mM EDTA,1mM DTT,20mM 钼酸钠)、10%甘油,然后用高速分散器制成匀浆。离心(1000×g,10分钟),取沉淀部分(粗核),用缓冲液洗涤两次,制成0.4M氯化钾悬浮液,再加 DTT 达10mM,提取过夜,然后离心,上清液为粗核提取液。将匀浆后第一次离心所得上清液加1/10体积活性炭/葡聚糖 T-70液(浓度为5%/0.5%)以去除内源类固醇激素,然后离心10分钟(2000×g),上清液(粗胞液)用于细胞质的特异结合测定。

进行结合分析时,用不同浓度 ^3H -睾酮(上海原子核研究所产品,87ci/mmol;使最终反应浓度在0.625~10nmol/L)±睾酮(最终浓度为0.125~2μmol/L)与受体样品在0℃~4℃保温18~20小时,用活性炭/葡聚糖T-70液处理,离心,上清液测放射活性;结果经绘制饱和曲线和Scatchard作图求得每份样品的特异结合。

细胞质和细胞核特异结合的单位均用fmol/mg蛋白表示。由于骨膜中DNA的含量偏低,同时在结合分析时所用的核制备物已经提取,可以测出蛋白的含量,所以细胞核的特异结合亦换算为蛋白来表示。

结 果

测定结果见表。

表 骨膜睾酮特异结合测定结果

(单位: fmol/mg蛋白)

	雄 仔 鹿				雌 鹿							
	正 常		去 势		仔 鹿				成 年 鹿		孕 鹿	
					正 常		去 势		正 常		正 常	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
细胞质	29.32	未测到	未测到	未测到	未测到	未测到	未测到	未测到	未测到	未测到	40.53	未测到
细胞核	169.63	未测到	595.84	未测到	未测到	未测到	223.21	未测到	未测到	未测到	未测到	未测到

I: 生茸区骨膜 II: 非生茸区骨膜

对雄鹿的测定结果表明,正常和去势的生茸区骨膜中都存在着一定数量的睾酮特异结合;但所有非生茸区的骨膜以及去势鹿的小肠均未测到睾酮的特异结合。

对雌鹿的测定结果表明,正常雌仔鹿生茸区和非生茸区骨膜均未测到睾酮的特异结合;而去势雌仔鹿的生茸区骨膜却存在睾酮特异结合,非生茸区骨膜未测到睾酮特异结合。成年正常雌鹿的生茸区和非生茸区骨膜均未测到睾酮特异结合。怀孕鹿生茸区骨膜含有一定量的睾酮特异结合,而非生茸区骨膜却未测到。

讨 论

本实验的结果初步证明,雄仔鹿和去势雌仔鹿生茸区骨膜存在睾酮的特异结合部位,表明这些鹿的生茸区骨膜中存在着雄激素受体。同时很可能睾酮直接作用于这些生茸区骨膜,也就是说,这些具有特殊功能的生茸区骨膜是睾酮的靶组织;而不存在睾酮特异结合部位的非生茸区骨膜和小肠则不是睾酮的靶组织。这一结果支持Fennessy等关于睾酮对生茸区骨膜直接作用的假说,并为该假说提供了实验依据。

Bubenik, G.之所以认为雄激素刺激角柄的发生是通过其在建立生茸区骨膜和生茸中枢的神经联系上发挥作用,是为了解释在角柄发生前,也就是在雄激素发挥作用前,将生茸区骨膜剔除,鹿终生不发生角柄;但若在角柄发生后,也就是在雄激素发挥作用之后,再剔除这些骨膜,或连同角柄骨质及角柄周围一定范围的骨膜组织都剔除,也不能抑制以后角柄的再生和鹿茸的发生,只有破坏角柄及周围的大面积组织才能抑制角柄发生这一现象。他认为在角柄发生前,生茸区骨膜与生茸中枢的神经联系还没有在雄激素的作用下建立起来,所以将生茸区骨膜剔除后,角柄再不能发生;而角柄一经发生,即在雄激素的作用下,生茸区骨膜与生茸中枢已经建立起了神经联系,这时再将这些组织剔除,就不会抑制角柄的发生。但如果将生茸区周围的大面积组织破坏,则全部切断了生茸中枢与这些组织的联系,因此抑制了角柄和鹿茸的发生。有关生茸中枢的假说是Bubenik, A.等^[7]提出来的,目的是解释鹿对鹿茸组织损伤有记忆功能等现象。但Bubenik, G.用该假说解释雄激素作用于角柄发生的机制,是否正确,还应进一步证明。本文所提供的实验结果初步证实,生茸区骨膜是雄激素的靶组织,其在受到鹿自身或外源适量的雄激素刺激后,可诱导其下部和周围的组织发生成骨作用,以这种方式合成角柄组织。当生茸区骨膜受到雄激素的刺激后,对其下部和周围一定范围的组织发挥诱导作用,使它们都具备了成骨的能力,这时即使将生茸区骨膜剔除,也不会抑制周围组织发生成骨作用,因此不能抑制角柄的最终发生;但若大面积损坏生茸区周围的组织,就完全清除了具备了成骨能力的组织,以致彻底抑制角柄的发生。

我们的结果还表明,正常雌鹿生茸区和非生茸区骨膜均未测出睾酮特异结合,这与雌鹿不生茸的现象是吻合的。去势雌仔鹿的生茸区骨膜中测到了睾酮特异结合,这一结果与Wislocki等和Jaczewski的实验所得结果有一致性。他们的结果表明,去势雌鹿易于被诱导发生角柄和鹿茸;但要诱导正常雌鹿,只有给以大量外源雄激素使其雄性化,才能成功。

综上所述,本文的结果为阐明角柄发生的机制提供了实验依据,有利于今后这方面的理论探索 and 实际应用研究。

参 考 文 献

- [1] Hartwig, H. and Schrudde, J., 1974. Experimentelle untersuchunge zur bildung der primären stirnanswuchse beim reh. (*Capreolus capreolus* L.) Z. Jagdwiss. 20: 1~13.
- [2] Jaczewski, Z. and Krzewska, K., 1974. The induction of antler growth in a red deer male castrated before puberty by traumatization of the pedicle. Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. V. 32: 67~72.
- [3] Wislocki, G.B., Aub, J.C. and Waldo, C.M., 1947. The effects of gonadectomy and the administration of testosterone propionate on the growth of antlers in male and female deer. Endocrinol., 40: 202~224.
- [4] Bubenik, G. B. 1983. The endocrine regulation of the antler cycle. in Brown, R. D. ed., Antler development in cervidae. Caesar Keleberg Wildlife Research Institute, Kingsville, Texas, 73~107.
- [5] Fennessy, P. F., and Suttie, J. M., 1985. Antler growth: Nutritional and endocrine factors. Biology of deer production. The Royal Society of New Zealand, 239~250.
- [6] 邹继超等, 1985, 兔子子宫内膜细胞核雌激素受体的分析. 动物学报, 31(1): 19.
- [7] Bubenik, A. B. and Pavlansky, R., 1965. Trophic responses to trauma in growing antlers. J. Exp. Zool., 159: 289~302.

MEASUREMENT OF TESTOSTERONE SPECIFIC-BINDING IN SIKA DEER ANTLEROGENIC SITE PERIOSTEUM

Li Chunyi, Bing Guoliang, Zhang Xuewen, Zhao Shizhen

(*Institute of Wild Animals and Plants, Chinese Academy of
Agricultural Sciences*)

Zou Jichao, Fan Zhiming
(*Institute of Zoology, Academia Sinica*)

Abstract

The testosterone specific-binding in the antlerogenic and nonantlerogenic site periosteum of six deer have been measured for illustrating the function of testosterone in the deer pedicle generation. For male deer, testosterone specific-binding was discovered in the antlerogenic site periosteum of intact deer (29.31 fmol/mg protein in cytoplasm and 169.63 fmol/mg protein in nuclei) and castrated one (595.84 fmol/mg protein in nuclei), but not in the nonantlerogenic one of these deer; For female deer, only in the antlerogenic site periosteum of castrated fawn (223.21 fmol/mg protein in nuclei), while not in the antlerogenic and nonantlerogenic site periosteum of any other deer. These data suggest that a certain amount androgen receptors may exist in the antlerogenic site of male (intact and castrated) fawn and female one (only castrated) and the receptor-contained periosteum as the target tissue of testosterone may be directly stimulated by testosterone.

Key words Antlerogenic site, Periosteum, Testosterone, Specific binding, Receptor