

梅花鹿 (*Cervus nippon hortulorum*)

茸角生长发育各阶段血浆睾酮、 雌二醇的含量变化

李春义 刘钟安 赵世臻

(中国农业科学院特产研究所)

杜玉川

(北京农业大学畜牧系)

摘 要

本文用放射免疫测定法对3个不同年龄组的雄性东北梅花鹿茸角生长发育各阶段外周血中的睾酮、雌二醇含量进行了测定。茸期两种激素差异很大, 睾酮含量低, 雌二醇高, 骨化期二者增高很快。对这两种激素含量的变化与茸角发育各阶段的关系进行了讨论。认为只有在二种激素同时增加时, 鹿角才能骨化。

关键词 (Key words): 梅花鹿 (*Sika deer, Cervus nippon hortulorum*), 鹿茸 (*Pilose antler*), 睾酮 (*Testosterone*), 雌二醇 (*Estradiol*), 放射免疫测定 (*Radioimmunoassay*)。

茸角是鹿科 (*Cervidae*) 动物雄性的第二性征, 其生长发育与性激素密切相关 (Chapman, 1975)。新茸在鹿外周血中雄激素处于低水平时开始萌动和生长, 雄激素水平上升则诱导鹿茸骨化而停止生长 (Wislocki, 1942)。给带茸鹿去势, 鹿茸还能生长相当长一段时间。上述情况表明, 鹿茸似乎不是取决于性激素。为此, Wislocki (1943) 提出了茸角受脑垂体分泌的一种“茸角生长刺激素”(AGS) 所控制的假说。这个假说尚未被严格的实验所证实。Bubenik (1983) 认为, AGS就是睾酮或其衍生物。他的理由如下, 其一, 睾酮对茸角发育有双重作用: 在某一临界值以下, 睾酮含量越高, 茸发育越快; 临界值以上, 含量越高, 骨化越快。故睾酮水平生茸期低, 骨化期高。其二, 去势鹿的肾上腺皮质可分泌相当量的雄性激素, 故带茸鹿去势之后, 鹿茸还能生长一段时间。

雌激素也与茸角生长发育密切相关。雌二醇能诱导去势雄鹿茸角的骨化 (Blauel, 1935), 且其骨化作用比睾酮强几倍 (Goss, 1968)。在体内, 睾酮能芳香化成雌二醇, 但一般不可逆 (等Morris, 1963), 可能是雌二醇的直接作用。在生茸的月份, 只有能生茸的公鹿才存在显著雌二醇峰, 而幼龄则没有 (Bubenik等, 1979)。睾酮的5种代谢产物中, 只有19-羟-睾酮对茸的骨化最有效, 这正是睾酮芳香化成雌二醇的中间物。若在用19-羟-睾酮的同时, 加芳香化酶的抑制剂, 则失去骨化作用 (Morris等, 1983)。高水平雌二醇能抑制骨角脱落 (Bubenik等, 1977)。

上述研究表明, 性激素是控制茸角发育的主要激素, 有可能是雌、雄激素协同作用

本文于1986年12月13日收到。

— 224 —

的结果。为此,本文通过测定梅花鹿生长发育各阶段外周血中睾酮和雌二醇含量,更深入的探讨性激素与茸角发育的关系。最后达到通过控制鹿外周血中性激素的含量,人为干预鹿茸生长,实现鹿茸高产的目的。

材料和方法

1. 动物 17头健康雄性东北梅花鹿,来源于中国农科院特产所鹿场。按年龄分为3组:第1组,8岁,6头;第2组,4岁,5头;第3组,3岁,6头。饲养管理与非试验鹿同。

2. 采血 1984年2月17日—12月22日,在上午10点左右由颈静脉采血,每次15毫升。McMillin等(1974)和Bubenik等(1979, 1982)报道和推测鹿外周血中性激素含量出现峰值的时候,每个峰采3次血,3个峰(脱盘前峰、生茸雌二醇峰、配种峰)共9次。当茸角外部形态发生显著变化的时候,分别在脱盘、分生眉枝(以小鞍子为准)和锯三叉茸前后各采3次血,共9次(其中分生眉枝与生茸期雌二醇峰采血时间相同,合并一起采)。在全年光照时间变化的关键点,即春分、夏至、秋分、冬至各采血1次,共4次。

3. 血样处理 用肝素抗凝(15国际单位/毫升静脉血),将离心所得血浆盛于安瓿瓶中,用硫柳汞防腐(血浆中最终浓度0.01%)安瓿瓶封口后于-40℃冰箱保存。

4. 睾酮、雌二醇含量测定 采用Furr(1973)的放射免疫测定法。测定药盒由上海市内分泌所提供。预测表明抗血清滴度和各种试剂均合格。本测定抗体最大结合为3.77—47.85%。睾酮批内变异系数为5%;雌二醇为5—10%。液闪仪为瑞典产LKB-1215型液体闪烁计数器。

5. 数据处理 先采用对数转换法,将所得标准曲线直线化,求出回归方程。计算睾酮、雌二醇含量。采用统计分析的方法,对所得平均数进行方差分析。对显著者用最小显著极差法的新复极差检验进行多次比较。McMillin(1974)报道,配种期鹿外周血中出现特别显著的睾酮峰,所以我们对从脱盘到锯三叉茸时期的睾酮含量单独进行分析,以免掩盖生茸期睾酮含量出现的真正差异。

结 果

1. 睾酮含量测定 茸角生长发育各阶段,梅花鹿外周血中的睾酮含量存在着明显的不同($P<0.01$)。而且不同年龄的生茸鹿睾酮含量变化模式相似(图1)。都在脱盘前和配种期出现高峰;在脱盘到锯茸前的时期一直处于低稳水平。

(1) 3组鹿全年外周血浆中睾酮含量变化的最低值都出现在生茸阶段(分别为:1.66±0.29; 1.20±0.27; 1.31±0.15毫微克/毫升血浆),而且此阶段的睾酮含量不存在显著差异($P>0.05$)。另外,3组鹿中的睾酮最低值、生茸阶段的睾酮平均含量(分别为:1.82, 1.51, 1.82毫微克/毫升血浆)都不存在显著差异($P>0.05$)。

每组第3头锯三叉茸时,外周血浆中的睾酮含量(分别为:3.21±0.33、2.03±0.32、3.77±0.55毫微克/毫升血浆)已开始上升。第1、3组与其最低值间存在着极显著的差异($P<0.01$);而第2组与最低值间不存在显著差异($P>0.05$),但比生茸期睾酮的平均含量有所升高(1.51—2.03毫微克/毫升血浆)。

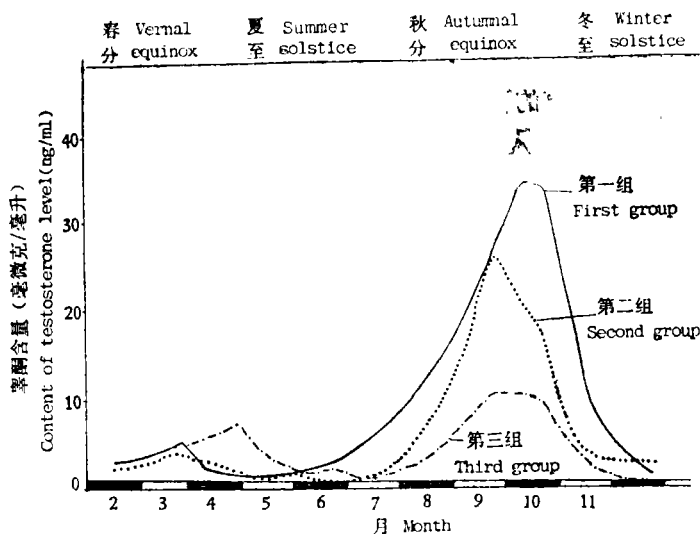


图1 3组鹿外周血浆中睾酮含量的变化
Fig.1 Variation of testosterone level in plasma of three groups

结果表明,生茸期外周血中睾酮含量不受生茸的不同时间和鹿年龄的影响,锯三叉茸时睾酮含量已有明显升高。

(2) 脱盘(角)前,3组鹿的血浆中都出现睾酮峰,称脱盘前睾酮峰。第1组(5.29 ± 0.21 毫微克/毫升血浆)与其最低值之间存在着显著差异($P < 0.05$);第2组(4.02 ± 0.97 毫微克/毫升血浆)与其最低值间不存在显著差异($P > 0.05$);第3组(7.46 ± 0.34 毫微克/毫升血浆)与其最低值间存在着极显著差异($P < 0.01$)。另外,3组鹿脱盘前的睾酮峰值间存在着极显著差异($P < 0.01$)。第3组显著高于第1、2组(分别为: $P < 0.05$; $P < 0.01$);但第1、2组间不存在显著差异($P > 0.05$)。

结果表明,除第2组外,脱盘前睾酮峰随鹿年龄增大而减小;从脱盘前峰的出现到脱盘的间隔时间随鹿年龄增大而缩短。

(3) 配种期3组鹿的外周血中都存在极为显著的睾酮峰,称配种睾酮峰。3组峰值(分别为: 34.67 ± 1.95 、 26.62 ± 2.53 、 11.09 ± 1.94 毫微克/毫升血浆)与各自最低值间都存在极显著差异($P < 0.01$)。3组峰值间也存在极显著差异($P < 0.01$)。第1组显著高于第2组($P < 0.05$)和第3组($P < 0.01$);第2组又显著高于第3组($P < 0.01$)。

结果表明,配种睾酮峰值随鹿年龄增大而加大。

2. 雌二醇含量测定 茸角生长发育各阶段,梅花鹿外周血中的雌二醇含量存在明显的不同($P < 0.01$),而且不同年龄生茸鹿的雌二醇含量变化模式相似(图2)。脱盘前(除第2组外);生茸期和配种期都出现高峰;锯茸时(除第2组外)处于最低水平。

(1) 3组鹿全年外周血中雌二醇含量变化的最低值都出现在锯茸时(分别为: 13.11 ± 1.72 、 14.53 ± 1.12 、 12.44 ± 2.13 微微克/毫升血浆)。第2组最低值出现在锯茸前一次,但把锯茸时的值作为最低值。3组雌二醇最低值间不存在显著差异($P > 0.05$)。锯茸时雌二醇含量不但最低,而且不受鹿年龄影响,但该值出现的时间随鹿年龄增大而提早。

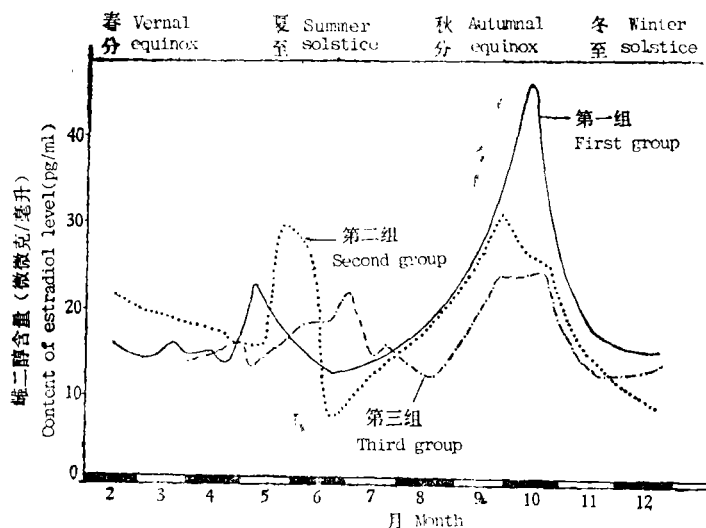


图2 3组鹿外周血浆中雌二醇含量的变化
Fig.2 Variation of estradiol level in plasma of three groups

(2) 除第2组外,第1、3组于脱盘前外周血浆中的雌二醇含量出现高峰,称脱盘前雌二醇峰。但峰值(16.25 ± 1.73 、 16.59 ± 1.55 微微克/毫升血浆)与各自的最低值间不存在显著差异($P > 0.05$)。这两个峰值间也不存在显著差异($P > 0.05$),表明不受鹿年龄的影响,该峰值出现的时间与同组相应的睾酮峰基本相同,故从该峰出现到脱盘的间隔时间随鹿年龄增大而缩短。

(3) 脱盘到锯茸前的生茸阶段,3组鹿的雌二醇含量都出现明显高峰,称生茸期雌二醇峰。3组峰值(分别为: 23.18 ± 1.50 、 29.85 ± 2.17 、 22.45 ± 1.65 微微克/毫升血浆)与各自的最低值间都存在极显著差异($P < 0.01$)。另外,3个峰值间也存在着显著差异($P < 0.05$)。第2组显著高于第1、3组($P < 0.05$);第1、3组间无显著差异($P > 0.05$)。

(4) 配种期(骨角期),3组鹿中存在明显雌二醇高峰,称配种雌二醇峰。3组峰值(分别为: 46.23 ± 4.01 、 31.61 ± 2.43 、 25.42 ± 2.76 微微克/毫升血浆)与各自最低值间都存在极显著差异($P < 0.01$)。另外,3组峰值间也存在极显著差异($P < 0.01$)。第1组显著高于第2、3组($P < 0.01$);第2组也高于第3组,但统计学上差异不显著($P > 0.05$)。配种雌二醇峰随鹿的年龄增大而加大。

3. 睾酮、雌二醇在茸角生长发育各阶段的协同变化 从图3、4、5可以看出,试验鹿茸角生长发育的每一特定阶段,都有特定比例的睾酮、雌二醇与之对应,这一点不受鹿年龄的影响。

在脱盘前和配种期,睾酮、雌二醇含量都出现高峰,而且每组鹿的两个峰值基本同时出现。

在生茸期,睾酮、雌二醇的含量变化截然不同,恰好在茸的快速生长期,睾酮含量最低,而雌二醇含量出现显著高峰。

在锯茸时,茸角基部已出现骨化点,此时睾酮含量已有明显升高,雌二醇含量是由下降到上升的转折点。

在茸角快速骨化期,睾酮、雌二醇含量几乎同步快速上升。

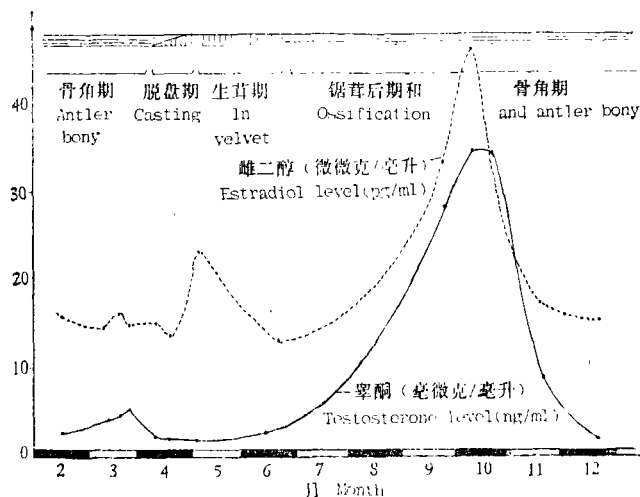


图3 第1组鹿外周血浆中睾酮和雌二醇含量变化
Fig.3 Variations of testosterone and estradiol levels in plasma of the first group

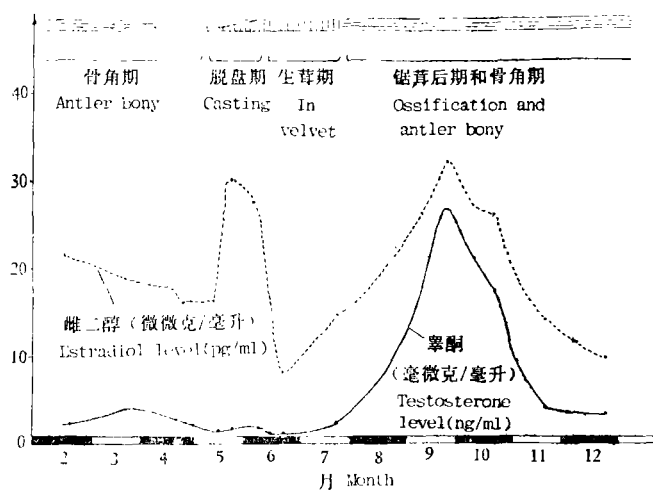


图4 第2组鹿外周血浆中睾酮和雌二醇含量变化
Fig.4 Variations of testosterone and estradiol levels in plasma of the second group

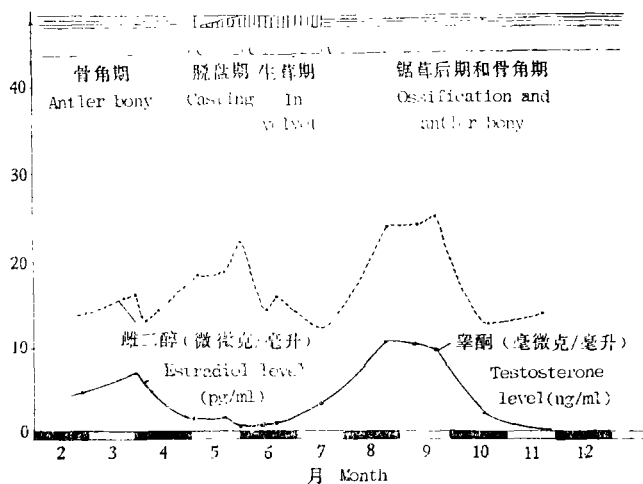


图5 第3组鹿外周血浆中睾酮和雌二醇含量变化
Fig.5 Variations of testosterone and estradiol levels in plasma of the third group

讨 论

1. **睾酮、雌二醇的含量变化与光照周期的关系** 从图1、2可以看出,鹿外周血中睾酮和雌二醇的含量变化是受光照周期变化所制约的。首先从第1组讲,在春分、秋分前后,分别出现两种激素的脱盘前峰和配种峰;在夏至和冬至前后,睾酮含量最低,雌二醇也于冬至出现低水平,但夏至前后出现高峰,这可能与生茸有关。这些结果说明,昼夜平分时能使鹿外周血中的睾酮、雌二醇处于高水平,这一点与Goss (1977)报道的一致;而光照长度的转折点,则使睾酮处于低水平。第2、3组与第1组同。但由于年龄越小的鹿生茸各阶段出现的越晚,所以与生茸有关的峰值和最低值出现的时间也相应推迟。

2. **脱盘前峰与脱盘的关系** 脱盘前鹿外周血中存在睾酮和雌二醇峰这一点,目前尚未见有人报道。Bubenik等(1982)曾作过这种推测,根据去势白尾鹿春季存在一明显的LH峰,而正常的却没有,原因是正常白尾鹿春季出现高浓度的睾酮,后者对LH形成有效负反馈。他们认为有关研究之所以没有发展春季有睾酮含量上升,即睾酮峰,是由于采血时间安排不当(每月一次)所致。本研究证明了这一推测。

脱盘前存在睾酮、雌二醇峰,那么这些峰有没有规律可循呢?首先就睾酮峰而言,第1组出现在3月26日,距脱盘23天;第3组4月29日,距脱盘52天;而第2组却在3月21日,距脱盘61天。另外,第3组峰值显著高于第1、2组;但第2组并不高于第1组。这些结果,从年龄上分析,脱盘前峰似乎不存在什么规律。但从图1可以看出,在第1、3组脱盘前的睾酮峰间,没有给第2组鹿安排采血,所以采血时间可能错过了第2组脱盘前峰应出现的地方。如果推测是正确的,那么脱盘前第2组也存在一显著的睾酮峰,且该峰应在第1组3月26日到第3组4月29日之间的某一天出现,该峰距脱盘的间隔时间应为第1组23天到第3组52天之间的某一天;该峰峰值应为第1组5.29毫微克/毫升到第3组7.46毫微克/毫升之间的某一数值。由于采血时间错过睾酮峰,依据第1、3组的结果也就错过了雌二醇峰。因此可以结论第2组也存在脱盘前雌二醇峰,且该峰与此时的睾酮峰出现在同一时间。

脱盘前睾酮、雌二醇峰可能与脱盘有关,因为第一,峰值出现的时间随鹿的年龄增大而提早,而鹿的脱盘情况正是如此。第二,睾酮峰随鹿年龄增大而减小。因为睾酮含量下降到一定的水平是鹿脱盘的先决条件,睾酮峰越低,下降到脱盘水平所需的时间就越短,所以年龄越大的鹿脱盘越早。第三,峰值到脱盘的间隔时间随鹿年龄增大而缩短。因为鹿年龄越大,睾酮峰越低,从睾酮峰下降到脱盘水平所需的时间就越短,鹿脱盘就越早。

3. **生茸期睾酮低稳水平、雌二醇高峰与生茸的关系** 生茸期睾酮含量一直处于低稳水平,与McMillin等(1974)和Bubenik等(1982)报道的结果基本相同,但生茸期最低值比上述报道的高1.8倍,这可能是鹿种不同的缘故。由于实验得出生茸期睾酮含量不受生茸时间和鹿年龄的影响,故可以推测生茸期的睾酮水平就是适于鹿茸快速生长的最佳水平。Bubenik (1983)认为去势鹿茸角的生长速度逐渐减低的原因是去势鹿外周血中的睾酮不能始终维持临界水平的缘故。生茸期睾酮低稳水平就是生茸的临界水平。这个水平在人为干预茸角生长发育的试验中,是首要考虑的因素。

生茸期雌二醇出现高峰与Bubenik等(1979)报道的白尾鹿一致,但峰值比白尾鹿

低3.62倍。关于生茸期雌二醇与生茸的关系问题, Bubenik等已提出了一些证据。另外, 通过对睾丸组织学的研究表明, 尽管在生茸期鹿睾丸的体积比配种期小的多, 但睾丸组织中能将睾酮芳香化成雌二醇的足细胞总数与配种期没有显著差异 (Marie-There Hchereau, Revies等, 1978)。本试验认为生茸期雌二醇峰与生茸有关的又一证据是, 该峰随鹿年龄减小而逐渐后延, 总是出现在快速生茸期。证明生茸是否依赖生茸期雌二醇峰的直接办法是, 在生茸期给睾酮施以抗雌激素药物, 在高含量的雌二醇失去作用后, 看其对生茸产生的影响如何, 如果该峰真与生茸有关, 在进行人为干预鹿茸生长发育时, 也要给予考虑。

4. 睾酮、雌二醇对茸角生长发育的协同作用 在生茸期, 鹿外周血中出现的雌二醇高峰, 没能导致茸角骨化; 而在茸角骨化期, 给鹿施以抗雌激素 (MER-25- 和 CI-628), 使高含量雌二醇失去作用, 则茸角不能完全骨化 (Bubenik等 1978); 在骨化期, 单独给鹿施以抗雌激素 (CA), 使高含量的睾酮失去作用, 鹿角也不能完全骨化 (Bubenik等, 1975)。根据这些研究结果, 作者认为只有一种性激素含量上升, 不能导致茸角完全骨化, 必须要有这两种性激素同时上升, 才能导致茸角完全骨化。

通过阐明性激素的含量变化与茸角生长发育的关系, 作者认为是能够人为地干预茸角生长发育的, 如给去势的公、母鹿施以抗睾酮、雌二醇, 使这两种性激素的含量始终维持在生茸期的水平上, 有可能实现鹿的连续生茸。

参 考 文 献

- Blauel, G. 1935 Beobachtung uber die Entstehung der perucke beim Rehbock. *Endocrinologie*, 15: 321—329.
- Bubenik, G.A. 1983 The endocrine regulation of the antler cycle in: R.D. Brown, ed., *Antler Development in Cervidae*, Caesar Kleberg Wildlife Research Institute, Kingsville, Texas.
- Bubenik, G.A. and A.B. Bubenik 1978b The role of sex hormones in the growth of antler bone tissue: Influence of antiestrogen therapy. *Saugetierkund. Mitt.* 26: 284—291.
- Bubenik, G. A., A.B. Bubenik, G.M. Brown and D.A. Wilson 1975b The role of sex hormones in the growth of antler bone tissue. I. Endocrine and metabolic effects of antiandrogen therapy. *J. Exp. Zool.* 194—358.
- Bubenik, G.A., A.B. Bubenik, G.M. Brown and D.A. Wilson 1977 Sexual Stimulation and Variation of plasma testosterone in normal, antiandrogen and antiestrogen treated white tailed deer (*Odocoileus Virginianus*) during the annual cycle. P. 377—386, in *Proc. 13th. Congress of Game Bio.* Atlanta.
- Bubenik, G.A., J.M. Morris, D. Schams and A. Claus 1982 Photoperiodicity and the circannual levels of LH, FSH and testosterone in normal and castrated male white-tailed deer. *Can. J. Physiol and Pharm.* 60: 788—793.
- Chapman, D.I. 1975 Antlers-bones of contention. *Mammal. Review*, 5 (4): 121—164.
- Furr, B. J. A. 1973 Radioimmunoassay of progesterone in peripheral plasma of the domestic fowl in various physiological states and in follicular venous plasma. *Acta Endocrinologica*, 72 (1).
- Hall, B.G., W.F. Ganong and E.B. Taft 1966 Hypophysectomy in the Virginia deer, technique and physiologic consequences growth. 30: 383—392.
- Goss, R.J. 1977 Photoperiodic control of antler cycles in deer IV. Effects of constant light: dark ration on circannual rhythms. *J. Exp. Zool.* 201: 379—382.
- Goss, R.J. 1968 Inhibition of growth and shedding of antlers by sex hormones. *Nature*, 220: 83—85.
- Marie-Therese Hochereau-de Reviers and G.A. Lincoln 1978 Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer (*Cervus elaphus*). *J. Reprod. Fer.* 54: 209—213.
- McMillin, J.M., U.S. Seal, K.D. Keenlyne, A.W. Erichon and J.E. Jones 1974 Annual testosterone rhythm in the adult whitetailed deer. *Endocrinol.* 94: 1034—1040.
- Mirarchi, R.E., P.F. Scanlon, R.L. Kirkpatrick and C.B. Schreck 1975b Variation in androgen levels in white-tailed deer in relation to antler cycle and breeding season. *J. Anim. Sci.* 40: 185.
- Morris, J. M. and G.A. Bubenik 1983 The effects of androgens on the development of antler bone

- in: R. D. Brown, ed., Antler Development in Cervidae, Caesar Kleberg Wildlife Research Institute, Kingsville, Texas.
- Wislocki, G. B. 1942 Studies on the growth of deer antlers: 1, on the structure and histogenesis of the antlers of the Virginiana deer (*Odocoileus virginianus borealis*). Amer. J. Anat. 7: 371—461.
- Wislocki, G. B. 1943 Studies on growth of deer antlers. P. 631—653. In: Essays in biology. Univ. Calif. Press.

外文摘要 (Abstract)

VARIATION OF TESTOSTERONE AND ESTRADIOL LEVELS IN PLASMA DURING EVERY STAGE OF GROWTH OF SIKA DEER ANTLER

LI Chunyi LIU Zhongan ZHAO Shizhen

(Institute of Special Products, Chinese Academia of Agricultural Science)

DU Yuchuan

(Animal Husbandry Department, Beijing Agricultural University)

The authors tested the contents of testosterone and estradiol in plasma of sika deer during every stage of growth of deer antler by radioimmunoassay in 1984. The role of sex hormones in the growth of deer antlers was discussed.

17 male sika deer from deer farm of the Institute of Special Products, Chinese Academy of Agricultural Science, were divided into 3 age groups. The first group had 6 individuals (8 years old), the second 5 individuals (4 years old), the third 6 individuals (3 years old).

In velvet, the contents of testosterone differed greatly from that of estradiol, the testosterone level was low and the estradiol high during the fast growth period of pilose antler.

In ossification and antler bony period, the contents of testosterone and estradiol increased fast.

The authors considered that there was a cooperation of testosterone and estradiol in the growth of deer antler, the pilose antler could become bony antler thoroughly only when the two sex hormones increased at the same time.