

LHRH-A₂ 及无机离子促进草鱼脑垂体 离体分泌 GH 的初步研究

陈细华 陈松林 邓文涛

(中国水产科学研究院长江水产研究所 荆州 434000)

摘要 用培养瓶(皿)培养法研究 LHRH-A₂、Ca²⁺、K⁺ 对草鱼脑垂体器官分泌 GH 的影响。结果表明, 1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L 和 1 000 nmol/L 的 LHRH-A₂ 都能显著促进 GH 的分泌; 随着 Ca²⁺ 浓度(0.1、1.3 mmol/L)的增高 GH 的分泌增强, 在 1 mol/L 和 3 mmol/L Ca²⁺ 条件下的 GH 分泌水平显著高于在 0.1 mmol/L Ca²⁺ 条件下的 GH 分泌水平; 随着 K⁺ 浓度(0.25、2.5、25 mmol/L)的增高 GH 的分泌显著增强。

关键词 LHRH-A₂ Ca²⁺ K⁺ 草鱼脑垂体 离体培养 GH

在离体条件下研究鱼类脑垂体(器官或细胞)分泌 GH(生长激素)的调控因素是了解鱼类生长发育调控机理的重要的和便捷的途径。到目前为止, 由于受 GH 特异性检测技术等因素的限制, 这类研究报告还只来自金鱼和鲤鱼等极少数种类^[1]。林信伟等报道鲤鱼脑垂体碎片对 GH 的分泌受 LHRH-A(促黄体素释放素类似物)的促进, 依赖于 Ca²⁺, 并受高浓度 K⁺ 的刺激^[2,3]。另一方面, 从理论上讲, 器官层次上的研究比组织碎片或细胞层次上的研究较好地维持了器官组织原有的三维结构因而更能揭示组织细胞原有的生理功能特性^[4]。本文以草鱼脑垂体器官作材料, 运用培养瓶和培养皿培养法, 研究 LHRH-A₂(促黄体素释放素类似物 2 号)、Ca²⁺ 和 K⁺ 对脑垂体分泌 GH 的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 所用草鱼为性未成熟的成鱼, 体重 1.5~2.5 kg。经暂养后自鳃放血, 在无菌室中去头盖骨, 细心摘取完整脑垂体, 用含青、链霉素的 Dulbecco's 平衡盐溶液清洗数次至去尽油滴后备用。

1.2 实验设计 LHRH-A₂ 实验组: 脑垂体 4 个, 随机平分为 2 组, 每个脑垂体再作纵切开。

按组别及培养时间顺序的不同, 每组用 5 ml 含 0~1 000 nmol/L 的 LHRH-A₂(焦谷·组·色·丝·酪·D-丙·亮·精·脯·乙基胺, 分子质量 1 166 u, 宁波市激素制品厂 1997 年产品)的 Dulbecco's 盐溶液(实验液, 共 5 种)在 100 ml 培养瓶中 20℃ 培养。用振荡器使脑垂体在实验液中作缓慢来回摆动。每隔 3 小时更换一次实验液, 每种实验液各重复 4 次。

Ca²⁺、K⁺ 实验组: 脑垂体 30 个, 随机平分为 5 组。按组别及培养时间顺序的不同, 每组用 10 ml 含不同 Ca²⁺、K⁺ 浓度的 Dulbecco's 盐溶液(实验液, 共 5 种)在 Φ6 cm 培养皿(带盖)中 15℃ 培养。每隔 12 小时更换一次实验液, 每种实验液各重复 5 次。Ca²⁺、K⁺ 分别由实验液中的 CaCl₂、KCl 提供, 其浓度的升降由等摩尔的 NaCl 来平衡。

1.3 样品液的收集及 GH 浓度的测定 每次更换实验液时即收集含有脑垂体分泌物的实验液即样品液, -20℃ 冻存后离心取上层液, 然后按我们建立的草鱼 GH 酶联免疫吸附测定技术^[5]测定其中草鱼 GH 的浓度。每个样品作双

* 中国水产科学研究院科研基金资助 No. 96-08-02;

第一作者简介: 陈细华, 男, 35 岁, 助研, 硕士;

收稿日期: 1998-02-23, 修回日期: 1998-08-10

份重复测定。

1.4 数据分析方法 每种实验液条件下所获得的重复样品的重复测定数据统计为“平均值±标准差”,作为该实验液条件下的实验值(GH分泌水平, ng/ml)。实验值之间的比较采用“*t*-检验”,当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结果

2.1 LHRH-A₂ 对草鱼脑垂体离体分泌 GH 的影响 如图 1 所示,在 1、10、100、1 000 nmol/L 4 种剂量的 LHRH-A₂ 刺激下,脑垂体的 GH 分泌水平(1 192.3 ± 130.8、1 243.8 ± 71.9、1 278.0 ± 81.5、1 204.2 ± 93.6 ng/ml, $n = 4$)都显著高于没有 LHRH-A₂ 存在(剂量为 0)时的分泌水平(773.6 ± 165.4, $n = 4$)。在 1~100 nmol/L 剂量范围内, GH 分泌水平随剂量增大而增大,当剂量为 1 000 nmol/L 时, GH 分泌水平有所下降,但仍高于剂量为 1 nmol/L 时的 GH 分泌水平。4 种剂量条件下的 GH 分泌水平之间没有显著性差异。

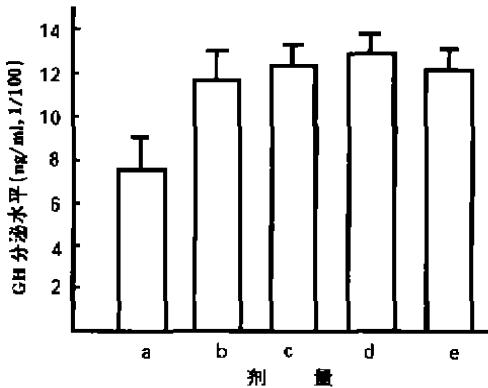


图 1 不同剂量 LHRH-A₂ 对草鱼脑垂体离体分泌 GH 的影响

a: 0 nmol/L LHRH-A₂ b: 1 nmol/L LHRH-A₂
c: 10 nmol/L LHRH-A₂ d: 100 nmol/L LHRH-A₂
e: 1000 nmol/L LHRH-A₂

2.2 Ca²⁺、K⁺ 对草鱼脑垂体离体分泌 GH 的影响 如图 2 所示,随着 Ca²⁺ 浓度(0.1、1、3 mmol/L)的增高,脑垂体的 GH 分泌水平升高。3 mmol/L 和 1 mmol/L Ca²⁺ 条件下的 GH 分泌水平(6 611.1 ± 1 790.8 和 6 129.2 ± 868.9

ng/ml, $n = 5$)之间没有显著性差异,但都与 0.1 mmol/L Ca²⁺ 条件下的 GH 分泌水平(4 014.6 ± 1 207.6 ng/ml, $n = 5$)之间存在显著性差异。随着 K⁺ 浓度(0.25、2.5、25 mmol/L)的增高,脑垂体的 GH 分泌水平显著性地升高(依次为 3 442.1 ± 1 339.8、6 129.2 ± 868.9、7 964.3 ± 1 398.2 ng/ml, $n = 5$)。

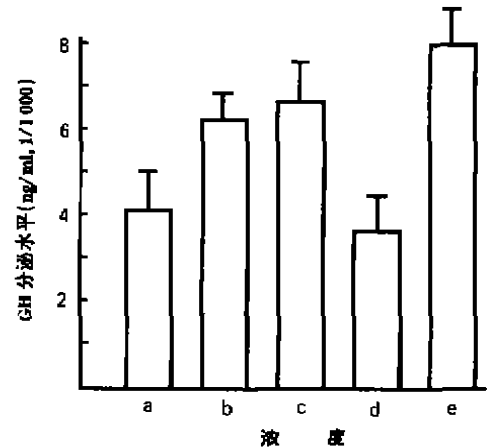


图 2 不同浓度 Ca²⁺、K⁺ 对草鱼脑垂体离体分泌 GH 的影响

a: 0.1 mmol/L Ca²⁺, 2.5 mmol/L K⁺ b: 1 mmol/L Ca²⁺, 2.5 mmol/L K⁺ c: 3 mmol/L Ca²⁺, 2.5 mmol/L K⁺
d: 0.25 mmol/L K⁺, 1 mmol/L Ca²⁺ e: 25 mmol/L K⁺, 1 mmol/L Ca²⁺

3 讨论

本文结果表明,不同剂量(1~1 000 nmol/L) LHRH-A₂ 能显著促进草鱼脑垂体器官离体分泌 GH;随着 Ca²⁺ 浓度(0.1~3 mmol/L)或 K⁺ 浓度(0.25~25 mmol/L)的增高, GH 的分泌随之增强。

上述结果与林信伟等对离体灌流鲤鱼脑垂体碎片的研究报道^[2,3]相似,不同的是关于 LHRH-A、Ca²⁺、K⁺ 的剂量或浓度与对 GH 分泌促进效应之间的关系,由于实验材料和方法不一,所获得的结果不完全一致。在林信伟等的报道中, LHRH-A 是以剂量(1、10、100 nmol/L 三种)依存的形式刺激 GH 分泌的,其效应过程呈脉冲式;1 mmol/L Ca²⁺ 条件下的 GH 分泌水平显著高于 0.1 mmol/L 和

10 mmol/L Ca^{2+} 条件下的 GH 分泌水平; 50 mmol/L K^+ 能刺激 GH 的分泌。而在我们的实验中, 四种剂量 LHRH-A₂ 条件下的 GH 分泌水平之间不存在显著性差异, 其中 1 000 nmol/L 的 LHRH-A₂ 对 GH 分泌的促进作用反而没有 10 nmol/L 或 100 nmol/L 两种剂量那么强烈, 推测可能的原因是脉冲式效应过程中的显著性差异被长达 3 小时“静态”培养中 GH 累计分泌量所掩盖, 不同种类的脑垂体及其不同的结构层次对 LHRH-A 的反应不一, LHRH-A₂ 促进 GH 分泌可能存在着高剂量条件下的负反馈作用等。1 mmol/L Ca^{2+} 条件下的 GH 分泌水平显著高于 0.1 mmol/L Ca^{2+} 条件下的 GH 分泌水平, 当 Ca^{2+} 浓度高达 3 mmol/L 时 GH 分泌水平仍然高于当 Ca^{2+} 浓度为 1 mmol/L 时的 GH 分泌水平, 但两者之间已无显著性差异; 我们曾用对草鱼脑垂体器官进行灌流实验, 也证实了 GH 的分泌水平与 0.5~4 mmol/L 的 Ca^{2+} 浓度成正相关^[6]。结合林信伟等的报道可以推测, 对于鱼类脑垂体离体分泌 GH 而言, 培养液中 Ca^{2+} 的“合适浓

度”可能是 1~4 mmol/L。此外, 根据笔者的经验, 当以 Dulbecco's 或 Hank's 平衡盐溶液为母液的实验液中 Ca^{2+} 的浓度大于 4 mmol/L 时, 极易产生钙的沉淀, 所以本文未能研究更高浓度 Ca^{2+} 对脑垂体分泌 GH 的影响。本文研究证实 K^+ 是以浓度 (0.25~25 mmol/L) 依存的形式显著促进 GH 分泌的, 这也与我们以前对灌流草鱼脑垂体器官的研究结果^[6]相吻合。

参 考 文 献

- 1 林浩然. 鱼类生长和生长激素分泌活动的调节. 动物学报, 1996, 42(1): 69~79
- 2 林信伟, 林浩然, 张庆. 促性腺激素释放激素类似物促进鱼类生长激素分泌和生长. 水产学报, 1993, 17(4): 282~288
- 3 林信伟, 林浩然. 细胞外 Ca^{2+} 和 K^+ 对鲤鱼脑垂体离体生长激素分泌的影响. 水产学报, 1993, 17(1): 8~12
- 4 Freshney, R. I. Animal cell culture; a practical approach. IRL Press, 1987, 149
- 5 陈松林, 陈细华, 邓文涛等. 草鱼生长激素非竞争式酶联免疫吸附测定法的建立及鉴定(英文). 动物学报, 1996, 42(4): 386~393
- 6 陈细华, 陈松林, 邓文涛等. 长时间灌流式器官培养方法. 动物学杂志, 1998, 33(6): 31~33