

细胞外 Ca^{++} 对脉冲式和持续性鲑 GnRH 类似物刺激鲤 GtH 分泌的影响 *

林信伟 李英文** 林浩然

(中山大学生物系, 广州 510275)

提 要

2min 脉冲式 10nmol 鲑 GnRH 高效类似物 sGnRH-A ($\text{Arg}^6\text{Trp}^7\text{Leu}^8\text{Pro}^9\text{NEt-LHRH}$) 刺激导致离体灌流培育的鲤脑垂体迅速产生显著的 GtH 分泌峰, GtH 分泌在刺激后 30min 内恢复到基础水平。4h 10nmol/L sGnRH-A 持续性刺激导致灌流培育的鲤脑垂体 GtH 分泌出现脱敏反应, 整个过程包括刺激后迅速的 GtH 分泌峰相和随后持续低水平的 GtH 分泌相。无 Ca^{++} 的灌流液或用 EGTA 融合了灌流液中的 Ca^{++} 对灌流培育的鲤脑垂体基础 GtH 分泌没有影响, 但导致脑垂体对 2min 10nmol/L sGnRH-A 刺激的 GtH 分泌反应显著降低以及脑垂体对持续性 10nmol/L sGnRH-A 刺激的 GtH 分泌的脱敏反应消失, 而仅出现低水平的 GtH 分泌反应。

关键词 鲑 GnRH 类似物, 促性腺激素, 钙离子, 鲤

在哺乳类, 一般认为促性腺激素释放激素 (GnRH) 从下丘脑以脉冲式释放后促进脑垂体促性腺激素 (GtH) 的间歇性分泌, 脑垂体对 GnRH 刺激的 GtH 分泌反应依赖于 GnRH 刺激的持续时间、频率和幅度大小等^[1-3]。重复引入脉冲式 GnRH 刺激后, 脑垂体可保持长时间对 GnRH 刺激的脉冲式 GtH 分泌反应, 但若引入高剂量 GnRH 或其高效类似物的长时间持续性刺激, 则可迅速导致脑垂体 GtH 分泌细胞对进一步的 GnRH 刺激的脱敏^[4-6]。脱敏是脑垂体 GtH 分泌细胞的一个重要特性, 其机理尚未被完全阐明, 但一般认为包括 GnRH 受体的下调 (Down-regulation)、GtH 合成的抑制以及更重要的 GnRH 受体与细胞内效应物之间的解偶联^[7,8]。在受体后调节机理中, Ca^{++} 依赖的电位敏感性 Ca^{++} 通道 (VSCC) 的失活是促进脑垂体 GtH 分泌细胞开始脱敏的重要因素^[9]。

在硬骨鱼类中, 有关脑垂体 GtH 分泌反应动力学特性的研究报道甚少。鱼类脑垂体 GtH 分泌是否存在脱敏反应也无一致的结果^[10-12]。本文采用离体灌流培育 (Perfusion) 方法, 研究脉冲式和持续性鲑 GnRH 高效类似物 sGnRH-A ($\text{Arg}^6\text{Trp}^7\text{Leu}^8\text{Pro}^9\text{AEt-LHRH}$) 对鲤脑垂体 GtH 分泌的刺激作用以及细胞外 Ca^{++} 对 sGnRH-A 作用的影响。

* 高校博士点科学基金和加拿大国际发展研究中心 (IDRC) 资助的课题。

** 通讯联系人。

1993年12月7日修回。

1 材料和方法

性腺正在发育的鲤 (*Cyprinus carpio* Linnaeus), 不分性别, 体重 523.1 ± 96.1 g, 性腺成熟系数为 $13.6 \pm 4.5\%$, 购自广州农贸市场。实验前在室温和自然光周期下暂养于室内水族箱内。

鲤脑垂体碎片离体灌流培育系统参照金鱼脑垂体碎片的离体灌流培育系统^[13], 仅稍作修改。鲤断头放血后, 取出脑垂体制备成小于 1mm^3 的碎片。将每份相当于半个脑垂体的碎片分别转移到四个 0.3ml 的灌流培育室中, 并置于两层 Cytodex 微载体之间。脑垂体碎片用 199 培养液(含 Hanks 盐溶液、 25mmol/L HEPES 和 15IU/ml 制霉菌素)预灌流过夜 ($8-10\text{h}$, 5ml/h)。实验前 2h , 用含 25mmol/L HEPES 和 0.1% 牛血清白蛋白的 Hanks 盐溶液(简称 HBSS)代替 199 培养液继续预灌流 2h , 并在最后 30min 收集每 10min 一管的样品, 测定灌流前平均 GtH 分泌值。预灌流后, 四个灌流柱的脑垂体碎片分别用正常 HBSS (对照)、无 Ca^{++} HBSS、含 1.25mmol/L EGTA 和含 5mmol/L EGTA 的 HBSS 灌流 1h , 然后分别引入一个 2min 10nmol/L sGnRH-A 脉冲式刺激, 继续分别用上述灌流液灌流 1h ; 或分别用含有 10nmol/L sGnRH-A 的上述灌流液持续性灌流 4h 。脉冲式和持续性实验分别重复四次。引入脉冲式或持续性 sGnRH-A 刺激之前, 收集每 10min 一管的样品 (1h , 共 6 管)。引入刺激后改为每 5min 一管。样品贮于 -28°C 待测。灌流温度为 $19 \pm 1^\circ\text{C}$ 。无 Ca^{++} HBSS 为缺 CaCl_2 的 HBSS, 另加 $100\mu\text{mol/L}$ EGTA。sGnRH-A (美国加州 Salk 研究所赠送)用 HBSS 配制成 $10\mu\text{mol/L}$ 贮存液, 实验时再分别用各自灌流柱的灌流液稀释至所需浓度。

样品中 GtH 含量的测定采用本实验室建立的鲤成熟 GtH 的放射免疫测定法。脉冲式刺激产生的 GtH 分泌反应的定量分析方法参照 Habibi 等^[13]即把脉冲式刺激引入前 1h 的样品的 GtH 含量平均值作为平均基础分泌值 (Prepulse), 把脑垂体对脉冲式 sGnRH-A 刺激的 GtH 分泌反应定量为 30min 内 GtH 分泌反应值之和, 再把此值转换为平均基础 GtH 分泌值的百分数 (%Prepulse)。各数据以平均值 \pm 标准差表示, 在不同灌流液中脉冲式 sGnRH-A 刺激的 GtH 分泌反应平均值以及不同灌流液灌流前后平均基础 GtH 分泌值的差异分别采用 Duncan 氏新复极差检验和 t 检验, 当 $p < 0.05$ 时, 认为差异显著, 在插图中用不同字母表示。

2 结果

用正常 HBSS 灌流培育的鲤脑垂体碎片接受 2min 脉冲式 10nmol/L sGnRH-A 刺激后迅速产生一个显著的 GtH 分泌峰, 在刺激 10min 内 GtH 分泌达到峰值, 然后下降, 在刺激后 30min 内 GtH 分泌都能恢复到基础水平 (图 1, A)。用无 Ca^{++} HBSS 或含不同浓度 EGTA 的 HBSS 灌流培育的鲤脑垂体的基础 GtH 分泌水平与预灌流时相比没有显著差异 (表 1); 但对 2min 脉冲式 10nmol/L sGnRH-A 刺激没有产生明显的 GtH 分泌峰, 在 5mmol/L EGTA 存在下, 脉冲式 sGnRH-A 的 GtH 释放作用基本消失 (图 1, B、C、D)。不同灌流液灌流培育的鲤脑垂体对脉冲式 sGnRH-A 刺激的 GtH 分泌反应的定量分析结果见图 2。用正常 HBSS 灌流培育的脑垂体对 2min 10nmol/L

表 1 sGnRH-A 脉冲式刺激引入之前不同灌流液灌流前和灌流期间平均 GtH 基础水平 (ng/ml) 的比较 (n=4)

Tab. 1 Comparisons on the mean of basal GtH levels (ng/ml) prior to and during the perfusion of different solutions but before the introduction of 10nmol sGnRH-A pulses (n=4)

GtH 水平② 时间③	灌流液①	HBSS	5mmol/L EGTA + HBSS	1.25mmol/L EGTA + HBSS	无 Ca^{++} (Ca^{++} -free) HBSS
灌流前(预灌流) Before Treatment		68.3±11.1 ^a	77.9±17.7 ^a	84.4±20.5 ^a	74.4±21.5 ^a
灌流期间 During Treatment		64.9±10.0 ^b	76.5±21.0 ^b	83.3±19.0 ^b	77.9±29.6 ^b

① Perfusion solution ② GtH levels ③ Time

Statistically significant differences at $P<0.05$ are indicated by superscripts: a not different from b (Student's t test).

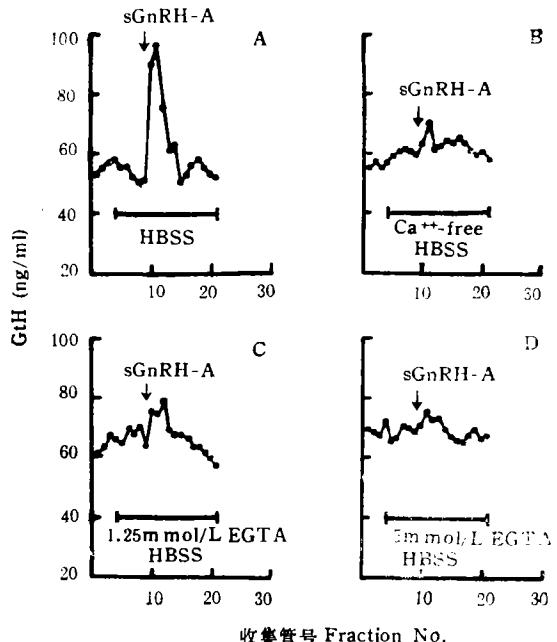


图 1 不同灌流液中基础的和 2min 10nmol/L sGnRH-A 刺激的 GtH 分泌过程

Fig. 1 Basal and 2-min 10nmol/L sGnRH-A-stimulated GtH releasing profiles in representative perfusion columns during perfusion with different solutions

sGnRH-A 刺激的 GtH 分泌反应值显著高于用无 Ca^{++} 或含不同浓度 EGTA 的 HBSS 灌流培育的脑垂体的反应值。无 Ca^{++} HBSS 以及含不同浓度 EGTA 的 HBSS 灌流培育的脑垂体的 GtH 分泌反应值之间无显著差异, 但在 5mmol/L EGTA 存在下, GtH 分泌反应值最低(图 2)。

与脉冲式刺激实验相似, 在接受持续性 10nmol/L sGnRH-A 刺激前, 用正常 HBSS、无 Ca^{++} HBSS 或含不同浓度 EGTA 的 HBSS 灌流培育的鲤脑垂体的平均基础 GtH 分泌水平与预灌流时没有显著差异(表 2)。在引入 10nmol/L sGnRH-A 持续性刺激

后,用正常 HBSS 灌流培育的鲤脑垂体的 GtH 分泌反应是双相的,包括 GtH 迅速分泌和脱敏两个过程,首先是迅速的 GtH 分泌峰相,峰相持续约 20min;然后 GtH 分泌下降到略高于基础分泌的低水平分泌相(约为基础分泌水平的 150%),并一直维持低水平且逐渐下降的趋势(图 3,A)。用无 Ca^{++} 或含不同浓度 EGTA 的 HBSS 灌流培育的脑垂体的 GtH 分泌没有明显的双相反应,它们的 GtH 分泌峰相消失,整个 GtH 反应过程保持低的(约为基础分泌水平的 150% 或更低)且逐渐下降的分泌水平(图 3,B、C、D)。

3 讨论

本结果表明 2min 脉冲式 10nmol/L sGnRH-A 刺激可产生显著的 GtH 分泌峰,但持续性的 10nmol/L sGnRH-A 刺激并没有导致持续性的 GtH 分泌增加,而是产生双相的脱敏反应。在哺

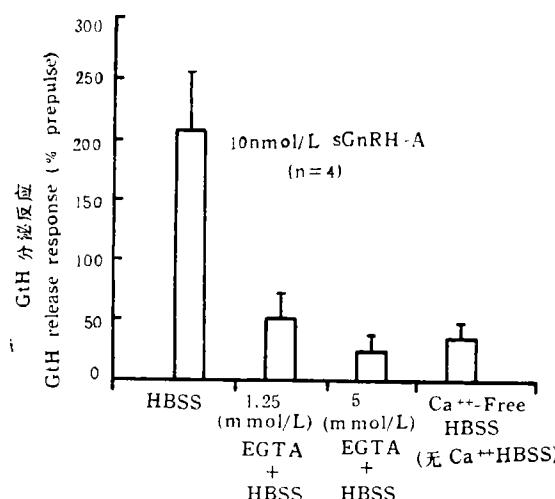


图 2 不同灌流液中 2min 10nmol/L sGnRH-A 刺激的 GtH 分泌反应值的比较

Fig.2 Comparison of 2min 10nmol/L sGnRH-A-stimulated GtH release in perfusion with different solutions

乳类,一般认为 GnRH 的生理作用方式是脉冲式的。在硬骨鱼类,目前还没有直接的证据表明 GnRH 的分泌和作用形式。一些鱼类的离体研究表明脉冲式(2min 或 5min)的 GnRH 刺激可以产生剂量依存的 GtH 分泌反应^[13,14],这些结果间接说明鱼类 GnRH 的生理作用方式是与哺乳类相似的。

10nmol/L sGnRH-A 持续性刺激导致灌流培育的鲤脑垂体产生的 GtH 分泌脱敏反应,并且脱敏反应形式与哺乳类脑垂体 GtH 分泌细胞脱敏过程中双相的 GtH 分泌

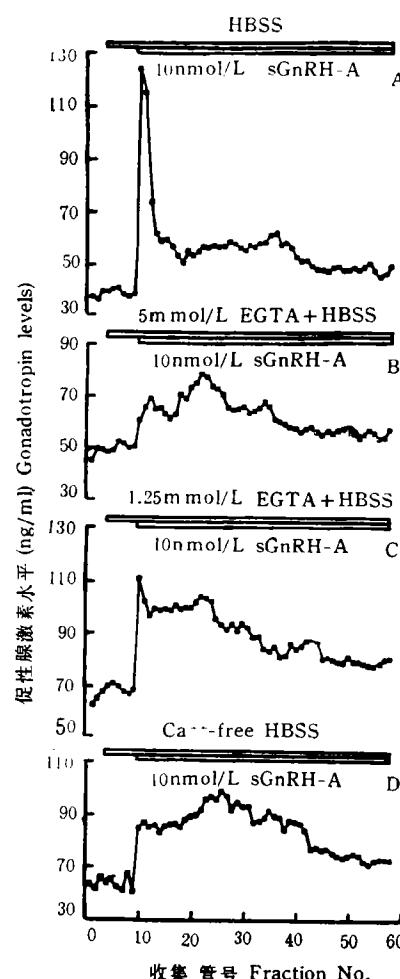


图 3 不同灌流液中基础的和 4h 10nmol/L sGnRH-A 持续性刺激的 GtH 分泌的过程

Fig.3 Basal and continuous (4h) 10 nmol/L sGnRH-A-stimulated GtH releasing profiles in representative perifusion columns during perifusion with different solutions

**表 2 sGnRH-A 持续性刺激引入之前不同灌流液灌流前和灌流期间平均基础 GtH 水平
(ng/ml) 的比较 (n=4)**

Tab.2 Comparisons on the mean of basal GtH levels (ng/ml) before and during treatment with different perfusion solutions but prior to the continuous exposure to 10nmol/L sGnRH-A (n=4)

GtH 水平②	灌流液①	HBSS	5mmol/L EGTA + HBSS	1.25mmol/L EGTA + HBSS	无 Ca^{++} (Ca^{++} -free) HBSS
时间③					
灌流前 Before Treatment		48.9±10.1 ^a	48.0±7.4 ^a	58.7±14.0 ^a	55.5±9.0 ^a
灌流期间 During Treatment		51.7±11.5 ^b	49.2±8.5 ^b	62.5±16.3 ^b	55.1±9.1 ^b

注: ①—③表注同表 1. Remarks are similar to those in tab.1.

十分相似^[4,9]。在罗非鱼 (*Tilapia galilaea*) 中, 脑垂体细胞并没有因长时间 GnRH 高效类似物 (约 0.128nmol/L) 的刺激而脱敏^[11], 100nmol/L 同样的 GnRH 类似物 (Ala⁶Pro⁹ NEt-LHRH) 刺激也能促使非洲鲇鱼 (*Clarias gariepinus*) 脑垂体碎片的 GtH 分泌持续增加至少 3h^[12]。最近, Habibi 等报道金鱼脑垂体接受 2h 的 sGnRH 或鸡 GnRH-II 持续性刺激后发生 GnRH 受体下调, 并导致 GtH 分泌对进一步 GnRH 肽刺激的脱敏。由此可见, 在不同种鱼类中离体脑垂体对 GnRH 或其高效类似物持续性刺激的反应并不一致, 这可能是由于不同实验中所用 GnRH 肽类型、剂量以及实验设计不同所致。据本结果, 可看出鲤脑垂体 GtH 细胞存在脱敏反应, 并与高等脊椎动物脑垂体 GtH 细胞的反应特性一致。

本结果证明无细胞外 Ca^{++} 存在下, 对灌流培育的鲤脑垂体的基础 GtH 分泌水平没有影响, 这与作者以前的结果¹⁾以及哺乳类中的研究结果是一致的^[16], 说明脑垂体基础 GtH 分泌不依赖细胞外 Ca^{++} 。相反, 脉冲式 sGnRH-A 刺激的鲤脑垂体离体 GtH 分泌依赖于细胞外 Ca^{++} , 无细胞外 Ca^{++} 或用 EGTA 融合 Ca^{++} 后, sGnRH-A 刺激的 GtH 分泌反应显著下降。在硬骨鱼类, GnRH 刺激 GtH 分泌作用的 Ca^{++} 依赖性已在金鱼^[17]和月鳢 (*Channa asiatica*)^[18] 中报道。因此, GnRH 刺激鱼类 GtH 分泌的机理可能与哺乳类的相似, 也包括 Ca^{++} 参与的第二信使系统。在哺乳类, 高浓度 (5mmol/L) EGTA 可融合细胞外 Ca^{++} 和细胞内 Ca^{++} 贮存^[19], 本结果中含 5mmol/L EGTA 的 HBSS 使 sGnRH-A 的 GtH 释放作用降低的幅度最大, 说明 GnRH 作用机理也包括细胞内 Ca^{++} 的变化。

本结果中细胞外 Ca^{++} 不仅影响脉冲式 sGnRH-A 的作用, 而且也影响持续性 sGnRH-A 的作用。细胞外 Ca^{++} 对持续性 GnRH 作用的影响在其它鱼类中尚无报道。在哺乳类, 细胞外 Ca^{++} 是产生脱敏所必需的^[20], GnRH 作用过程中引起 Ca^{++} 依赖的 VSCC 失活是脑垂体 GtH 细胞开始脱敏的主要因素。本结果表明无细胞外 Ca^{++} 存在下, 持续性 sGnRH-A 刺激导致的 GtH 分泌的脱敏反应消失, 表现为显著的 GtH 分泌峰相消失, 并保持低水平的持续的 GtH 分泌反应。因此, 鲤脑垂体 GtH 分泌的脱敏也

1) 林信伟等, 1995。细胞外 Ca^{++} 和 K^{+} 对鲤鱼脑垂体离体促性腺激素分泌调节的影响。海洋与湖沼(待刊)。

与 Ca^{++} 浓度的变化有关, 而无细胞外 Ca^{++} 存在下低水平的 GtH 分泌反应可能是由于细胞内 Ca^{++} 动员或非 Ca^{++} 依赖的机理所维持的。

参 考 文 献

- [1] Badger TM, Loughlin JS, Naddaff P G. The luteinizing hormone releasing hormone(LHRH)-desensitized rat pituitary: luteinizing hormone responsiveness to LHRH *in vitro*. *Endocrinology*, 1983, **112**: 795—799.
- [2] Waring D W, Turgeon JL. LHRH self-priming of gonadotropin secretion: time course of development. *Am.J. Physiol.*, 1983, **244**: C410—416.
- [3] Levine J E, Ramirez VD. Luteinizing hormone releasing-hormone during the rat estrous cycle and after ovariectomy, as estimated with push-pull cannulae. *Endocrinology*, 1982, **111**:1439—1448.
- [4] Evans W S, et al. Biphasic luteinizing hormone secretion in response to gonadotropin-releasing hormone during continuous perfusion of dispersed rat anterior pituitary cells: changes in total release and the phasic components during the estrous cycle. *Endocrinology*, 1983, **112**: 535—542.
- [5] Conn P M, et al. The molecular basis of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action in the pituitary gonadotrope. *Biol. Reprod.*, 1987, **36**: 17—35.
- [6] Smith M A, Vale WW. Desensitization to gonadotropin-releasing hormone observed in superfused pituitary cells on Cytodex beads. *Endocrinology*, 1981, **108**:752—759.
- [7] Chang J P, et al. Gonadotropin-releasing hormone stimulates luteinizing hormone secretion by extracellular calcium-dependent and -independent mechanism. *Endocrinology*, 1988, **123**: 87—97.
- [8] Clayton R N. Gonadotropin releasing hormone: its actions and receptors. *J. Endocrinol.*, 1989, **120**:11—19.
- [9] Stojilkovic S S, et al. Desensitization of pituitary gonadotropin secretion by agonist-induced inactivation of voltage-sensitive calcium channels. *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**: 10939—10942.
- [10] Habibi H R. Homologous desensitization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors in the goldfish pituitary: effects of native GnRH peptides and a synthetic GnRH antagonist. *Biol. Reprod.*, 1991, **44**:275—283.
- [11] Levavi-Zernovsky B, Yaron Z. Gonadotropin secretion from tilapia pituitary exposure *in vitro* to GnRH. *Reproducion in Fish-Basic and Applied Aspects in Endocrinology and Genetics*. (Y Zohar and B Breton eds.) INRA, Paris, 1988:75—79.
- [12] Deleeuw R, et al. The dopaminergic inhibition of the gonadotropin releasing hormone-induced gonadotropin release: an *in vitro* study with fragments and cell suspensions from pituitaries of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1986, **63**:171—177.
- [13] Habibi H R, et al. Functional relationship between receptor binding and biological activity for analogs of mammalian and salmon gonadotropin-releasing hormones in the pituitary of goldfish (*Carassius auratus*). *Biol. Reprod.*, 1989, **40**:1152—1161.
- [14] Chang J P, et al. Use of a pituitary cell dispersion method and primary culture system for the studies of gonadotropin releasing hormone action in the goldfish, *Carassius auratus*. I. initial morphological, static, and cell column perfusion studies. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1990, **77**:256—273.
- [15] 林信伟、李英文、林浩然。1995. 哺乳类、鸟类和鱼类GnRH及其类似物刺激鲤鱼离体脑垂体GtH和GH分泌作用的比较。水生生物学报(待刊)。
- [16] Stojilkovic S S, Izumi S, Catt KJ. Participation of voltage sensitive calcium channels in pituitary hormone release. *J. Biol. Chem.*, 1988, **263**:13054—13061.
- [17] Chang J P, Freedman G L, De Leeuw R. Use of a pituitary cell dispersion method and primary culture system for studies of gonadotropin-releasing hormone action in the goldfish, *Carassius auratus*. II. extracellular calcium dependence and dopaminergic inhibition of gonadotropin responses. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1990, **77**: 274—282.
- [18] Jamaluddin M D, et al. Requirement of extracellular calcium in fish pituitary gonadotropin release by gonadotropin-releasing hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1989, **74**: 190—198.
- [19] Bates M D, Conn P M. Calcium mobilization in the pituitary gonadotrope: relative roles of in-

- tra- and extracellular sources. *Endocrinology*, 1984, **115**:1380—1385.
[20] King J A, Davidson J S, Millar R P. Desensitization to gonadotropin releasing hormone in perifused chicken anterior pituitary cells. *Endocrinology*, 1986, **119**: 1510—1518.

EFFECTS OF EXTRACELLULAR CALCIUM ON THE GTH RELEASE IN COMMON CARP, *CYPRINUS CARPIO*, INDUCED BY PULSATILE AND CONTINUOUS ADMINISTRATION OF SALMON GnRH AGONIST

Lin Xinwei, Li Yingwen and Lin Haoran

(Dep. of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract

Two-min pulse of 10nmol/L sGnRH-A ($\text{Arg}^6\text{Trp}^7\text{Leu}^8\text{Pro}^9\text{NEt-LHRH}$) stimulated a rapid and significant release of GtH from perifused pituitary fragments of common carp. The GtH level then decreased and to its basal level within 30-min after the introduction of the sGnRH-A pulse. The continuous exposure of perifused pituitary fragments to 10nmol/L sGnRH-A for 4hrs resulted in desensitization including two phases: an initial peak phase of GtH release and a followed lower level phase of GtH release. The perfusion of the pituitary fragments with Ca^{++} -free Hanks salt solution or the salt solution containing EGTA (1.25 and 5mmol/L) did not influence the basal GtH release, but resulted in a significant decrease in GtH release if stimulated by 2-min pulses of 10nmol/L sGnRH-A and in disappearance of desensitization of GtH release which is induced by continuous administration of 10nmol/L sGnRH-A.

Key words Salmon GnRH aganist, GtH, Calcium ion, Common carp