

鱼类垂体腺苷酸环化酶激活多肽的研究进展

肖 东 林浩然
(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

ADVANCES IN THE RESEARCH OF PITUITARY ADENYLATE CYCLASE ACTIVATING POLYPEPTIDE IN FISH

XIAO Dong and LIN Hao-Ran
(School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

关键词: 鱼类; 垂体腺苷酸环化酶激活多肽; 下丘脑促垂体激素; 生长激素; 促性腺激素

Key words: Fish; PACAP; Hypophysiotropic hormone; Growth hormone; Gonadotropin

中图分类号: Q959.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)03-0296-06

垂体腺苷酸环化酶激活多肽(Pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide, PACAP)是1989年首次在绵羊下丘脑发现的具有广泛生物活性的多肽,是促胰液素/胰高血糖素家族新成员^[1]。在哺乳类,分离出两种活性的PACAP,即PACAP 38和27;PACAP 38由38个氨基酸组成,PACAP 27是PACAP 38氨基端的27个氨基酸残基,哺乳类PACAP 38和-27产生于同一前体分子;组织中PACAP 27的含量要比PACAP 38少的多^[2]。在哺乳类,PACAP及其受体分布十分广泛,具有多种生理功能。

在低等脊椎动物尤其鱼类,最初PACAP研究多集中于PACAP结构与进化,对其功能了解甚少,只是最近几年,一些研究者才开始涉足该领域^[3]。作者就近年来鱼类PACAP分子结构、分布与进化、受体及其分布和功能多样性最新进展作一综合评述,尤其着重阐明PACAP作为鱼类下丘脑促垂体激素在调节生长激素(Growth hormone, GH)和促性腺激素(Gonadotropin, GH)合成与分泌中的作用及作用机理。

1 鱼类PACAP分子结构、基因及进化

目前从非哺乳类如鸡、蛙、硬骨鱼类以及板鳃亚纲鱼类分离到PACAPs(即PACAP 38和27)^[4,5],PACAP 38也是硬骨鱼类脑中PACAP主要形式。

Sherwood等首次从红大麻哈鱼克隆到非鱼乳类PACAP,

由其cDNA推导的PACAP氨基酸序列显示,鲑PACAP激素原前体是由信号肽、不知功能的隐性肽(Cryptic peptide)、结构与生长激素释放激素(GH releasing hormone, GHRH)相似的45个氨基酸的肽和PACAP 38氨基酸序列组成^[6]。假设鱼类PACAP激素原前体单或双碱性裂解位点是保守的,该前体经翻译后的加工就可产生成熟PACAP 38和-27及GHRH-like肽;随后证实,确实有GHRH-like肽合成,且它可刺激银大麻哈鱼脑垂体细胞释放GH,提示PACAP cDNA编码的相关肽是鲑GHRH^[7]。金鱼PACAP cDNA编码175个氨基酸前体蛋白,可生成PACAP 38和GHRH-like肽,金鱼下丘脑检测到含GHRH编码区的全长PACAP mRNA转录本^[8]。而在哺乳类,PACAP和GHRH由两个不同基因编码,PACAP cDNA相应区域编码一个不知功能的PACAP相关肽(PACAP related peptide, PRP)。从鲤分离的GHRH能诱导金鱼和虹鳟脑垂体释放GH,但在此之前,未曾报道过鱼类GHRH基因。金鱼、鲑^[9]和斑马鱼^[10]PACAPs也被克隆;与鲑PACAP cDNA相似,GHRH-like肽编码序列始终位于PACAP编码区5'端上游。

与哺乳类GHRHs和PRP相应区域比,推导的鱼类GHRHs氨基酸顺序是多变的,仅有32%—41%同源性,只有中央核心区11—24位氨基酸序列比较保守。与哺乳类类似,斑马鱼和鲑PACAP基因也由5个外显子和4个内含子

收稿日期: 2001-07-20; 修订日期: 2001-10-30

基金项目: 国家自然科学基金(39570099); 广东省自然科学基金(980308)资助

作者简介: 肖 东, (1969—), 男; 理学博士, 讲师; 研究方向: 鱼类生长的神经内分泌调控。现工作单位: 中山大学实验动物中心, 广东广州
中山二路74号, 510089。Tel: 020-87331234(o), E-mail: Xiao_d@hotmail.com

通讯作者: 林浩然, Tel: 020-84113791(o), E-mail: Ls32@zsu.edu.cn

组成, GHRH 主要由外显子-4 编码, PACAP 由外显子-5 编码; 但与哺乳类不同, 鱼类 PACAP 基因 5' 端启动子没有 GAAT 和 TATA 框, 而由顺式作用调控元件取代; 蛙通过可变剪接产生全长转录本和缺少外显子-4(编码 GHRH) 的转录本; 虹鳟两种 GHRH/ PACAP 基因被鉴定, 但只有其中一种与上述两种转录本有关^[11]。金鱼和斑点^[12]两种类型的 PACAP mRNAs(即长的编码 GHRH 和 PACAP, 短的编码 PACAP) 在脑、脑垂体、肠、肝和性腺上也被鉴定, 其中斑点^[12]脂肪组织和骨骼肌上首次发现有 PACAP mRNAs 表达。可见, 鱼类 GHRH 和 PACAP 基因表达调控方式可能是不同的。

从原索动物向脊椎动物进化过程中, PACAP 分子结构非常保守。在迄今已研究的所有哺乳动物如人、大鼠、小鼠和绵羊, PACAP 38 氨基酸序列完全一致^[13]。哺乳类 PACAP 38 具有三个独立区域, 即 1—8 位氨基酸 (NH₂ 始端) 形成一个无序结构, 9—26 位氨基酸为一个向外伸展中心 α 螺旋区, 28—34 位氨基酸为短的 G 末端 α 螺旋尾巴, 且在第 27 位氨基酸处有一个灵活的铰链结构; 而 PACAP 27 除缺少 G 末端尾巴外, 其 3D 结构与 PACAP 38 是一样的^[14]。N 末端三联体 His-Ser-Asp (1—3 位氨基酸)、中心 α 螺旋区 (11—27 位氨基酸) 和 G 末端尾巴 (28—32 位氨基酸) 形成三个受体识别位点, 三个结构域中的任何两个均能与受体高亲和结合; 此外, 该三联体也是受体激活和信号传导所必须的, PACAP 38 竞争性拮抗剂 PACAP 6 38 就是由该结构缺失产生的。在鱼类, PACAP 肽的 3D 结构与哺乳类是否一样, 还未见报道。

哺乳类、鸟类、两栖类和鱼类的 PACAP 38 氨基酸序列具有很高同源性。蛙和鸡 PACAP 38 仅分别在第 35 和第 2 位有一个氨基酸与哺乳类不同^[15, 16]; 软骨鱼类日本鳐 (*Urolophus japonicus*) 和赤^[17] (*Dasyatis akajei*) PACAPs 氨基端 27 个氨基酸仅有个别与哺乳类不同, G 末端也仅有几个氨基酸被替换^[17], 与鸡、蛙和硬骨鱼 PACAP 38 也有很高同源性; 鲎和不同种类的蛙 PACAP 38 与哺乳类 PACAP 38 相比, 仅在 G 端有 3—4 个氨基酸不同, 氨基端 27 个氨基酸非常保守^[18]; 金鱼 PACAP 38 氨基酸序列与鲎、蛙、鸡和人 PACAP 38 同源性分别为 92.1%、89.5%、92.1%、87.2% 和 89.5%。可见, 动物进化过程中, PACAP 结构高度保守。

PACAP 祖先基因起源于胰高血糖素基因家族, 该过程通过外显子重复作用和随后而来的基因重复作用实现。*Chelyosoma productum* [一种被囊动物 (Tunicate)] 为亲缘关系与原始脊索动物文昌鱼非常近的非脊椎动物, 其 PACAP 27 cDNA 和部分基因被克隆, PACAP 27 分子结构也非常保守, PACAP 激素原前体中也存在 GHRH-like 肽, PACAP 27 mRNA 在神经腺有表达, 提示 PACAP 27 可能是原索动物神经肽类激素^[19]。采用基因组 DNA Southern 杂交法, 在海胆、被囊动物、芦鳗、硬骨鱼类和四足动物上检测到 PACAP 杂交信号, 而在细菌、酵母和果蝇则未检测到, 这表明 PACAP 基因首先在棘皮动物出现, 然后沿着后口动物进化树进化。PACAP 进化过程中, 硬骨鱼类 PACAP 基因完成了外显子重复过程, 其中由于严格选择导致编码 PACAP 外显子高度保守, 而低的

选择压力导致编码 GHRH 外显子展示出结构变异性。鸡 PACAP 基因被克隆, 鸡 PACAP 激素原前体组成与硬骨鱼的十分类似, 而哺乳类 PACAP 和 GHRH 由不同基因编码, 鱼类 PACAP 和 GHRH 则由同一基因编码^[20]。可见, 分别编码 PACAP 和 GHRH 基因分离的剪接仅是在哺乳类出现前才发生的事件。

2 鱼类 PACAP 组织分布与功能多样性

在哺乳类, PACAP 广泛分布于中枢和周围神经系统以及非神经组织中, PACAP 广泛组织分布特点预示 PACAP 具有多种功能。目前已知功能主要有: 在中枢神经系统, PACAP 作为神经递质、神经调质、下丘脑促垂体激素和神经营养因子; 在外周组织, PACAP 可调节血流、肠蠕动、气道扩张、 β 细胞中胰岛素分泌、卵巢中类固醇激素生成、肾上腺髓质中儿茶酚胺释放和合成; 此外, PACAP 在调节细胞因子分泌和生物钟节律等方面也起一定作用。

鱼类 PACAP 组织分布也十分广泛。Montero 等^[21]证实欧洲鳗鲡脑抽提液内含有 PACAP 样免疫反应物质; 欧洲鳗鲡不同脑区均有 PACAP 样免疫反应细胞分布, 其中端脑腹侧、间脑、中脑、小脑瓣和延髓处阳性纤维分布较为密集, 且 PACAP 样免疫反应阳性胞体仅在间脑、下丘脑的视前核和丘脑的背侧和腹侧核发现; 板鳃亚纲鱼类赤^[22]下丘脑分布有 PACAP 免疫反应阳性胞体和神经纤维。

欧洲鳗鲡、草鱼、金鱼^[23]、日本鳐^[24]和赤^[24], PACAP 免疫反应神经纤维和阳性胞体分布于脑垂体的不同区域。金鱼 PACAP 免疫反应神经纤维非常靠近中腺垂体的 GH 分泌细胞, 尤其靠近血管区域, 提示 PACAP 可能参与 GH 释放调节。蛙 PACAP 合成部位在脑, 而不在脑垂体。

鱼类 PACAP 在非神经组织分布也十分广泛, 且具有多种功能。大西洋鳕和虹鳟肠、鳃、血管、胰腺和膀胱上有 PACAP 样免疫反应阳性神经纤维分布, 预示 PACAP 可能参与肠蠕动和肠道激素分泌调节; PACAP 27 和 38 能抑制大西洋鳕肠自发收缩和肠近端收缩^[25, 26]。金鱼鳃弓上存在有 PACAP 样免疫反应物质, 预示 PACAP 可能调节鳃上某些物质(如黏液)分泌^[27]。Reid 等^[28]在大西洋鳕、虹鳟、欧洲鳗鲡、白斑角鲨和盲鳗后主静脉嗜铬细胞/组织上发现 PACAP 样免疫反应物质; PACAP 可调节嗜铬组织中儿茶酚胺释放, 人 PACAP 27 可促进虹鳟嗜铬组织中肾上腺素分泌, 对去甲肾上腺素分泌无影响^[29]。日本鳐直肠肠肌丛和平滑肌层分布有 PACAP 样免疫反应神经原胞体和神经纤维, 日本鳐 PACAP 可使由乙酰胆碱或 KCl 诱导而处于收缩状态的直肠松弛, 且经阿托品、心得安和酚妥拉明预孵育, 也不改变 PACAP 引起的抑制作用^[30]。mRNA 水平也证实, 鱼类 PACAP 组织分布十分广泛。鲎脑、精巢、卵巢和胃等上均检测到 PACAP/GHRH-like mRNA, 胰腺、脑垂体、肌肉和肝脏上未检测到。金鱼脑的不同部位均有 PACAP mRNA 表达, 甚至在脊髓也可检测到; 金鱼脑、脑垂体、精巢、肠和肾 PACAP mRNA 表达水平很高, 肝脏、心脏和卵巢很低, 鳃上未检测到。日本

腾直肠和斑马鱼脑、眼、胃肠道、卵巢及精巢上均发现有 PACAP mRNA 转录本。鱼类 PACAP 广泛组织分布和高度保守的分子结构预示, PACAP 在鱼类也具有多种生理功能。

3 鱼类 PACAP 受体及其分布

哺乳类 PACAP 受体广泛分布于各种组织中; PACAP 作用主要由三种类型受体介导, 即 PAC1、VPAC1 和 VPAC2, 均属于 G 蛋白耦联受体, 具有 7 个跨膜区(TMD); PAC1 受体(60KD) 为特异的 PACAP 受体, 主要分布于肾上腺髓质、睾丸、垂体、下丘脑和脑的其他部位及一些肿瘤细胞等; VPAC1 (58 KD) 受体和 VPAC2 (58 KD) 受体则指 PACAP/VIP 受体[血管活性肠肽(Vasoactive intestinal peptide, VIP), 该类受体与 PACAP 和 VIP 均具有同等亲和力], 主要分布于心、肺、肝、肾、前列腺和精囊等。

在哺乳类, PAC1 受体同系物(Isoforms) 是位于第三个细胞内环(Intracellular loop) hip/ hop1/ hop2 插入体可变剪接的结果; 该类受体与腺苷酸环化酶(Adenylate cyclase, AC) 和磷脂酶 C(Phospholipase C, PLC) 进行差异耦联。PAC1 受体两种附加变异体(即一个具有截短的 C 末端, 另一个第 4 跨膜区(TMD4) 结构发生改变) 被克隆; 与其他 PAC1 受体不同, TMD4 结构改变的变异体对环腺苷酸(cAMP) 和三磷酸肌醇(IP₃) 合成无影响, 但可激活 L-型 Ca²⁺ 通道引起 Ca²⁺ 内流。一般认为, VPAC1 和 VPAC2 不能激活 IP₃ 合成, 但可与依赖于 cAMP 的信号通路耦联。

鱼类 PAC1 受体已在金鱼和斑马鱼脑、脑垂体及其他组织上鉴定和克隆, 该受体 cDNA 核苷酸序列和受体氨基酸序列与哺乳类和人 PAC1 受体均具有相当高的同源性, 该受体也属于 G 蛋白耦联受体, 金鱼 PAC1 受体由 465 个氨基酸构成, 斑马鱼 PAC1 受体拥有两类同系物, 即一种含 hop2 插入体, 另一种不含, 从结构角度看, 金鱼和斑马鱼 PAC1 受体和哺乳类 PAC1 受体属于同系物^[31]。

在金鱼, VIP 对 cAMP 合成没有刺激作用, 进一步证实新克隆的金鱼 PACAP 受体的确是 PAC1 受体; PACAP 通过激活 PAC1 受体并进而诱导 GH 释放是依赖于 cAMP 蛋白质激酶 A (Protein kinase A) (cAMP-PKA) 信号通路的。金鱼 PAC1 受体 cDNA 在猴肾(Cos 7) 细胞上表达表明该受体可与 cAMP 合成进行功能性耦联; PACAP 38 和 -27 可特异促进 Cos 7 细胞中 cAMP 合成, 而 VIP、GHRH、促胰液素和胰高血糖素等则无此作用。另外, 金鱼 PAC1 受体表达具有组织特异性, 仅在脑、脑垂体和心脏检测到该受体转录产物, 而肝脏、肾脏、性腺、脾脏、肠道、鳃、肌肉和鳃耙则未检测到, 但用 RF-PCR 检测发现, 该类受体在这些组织中也有低水平表达。

金鱼 VPAC1 受体的两种同系物被克隆, 该受体氨基酸序列与人 VPAC1 受体仅有 62%—68% 同源性^[32]。与 PAC1 受体不同。金鱼 VPAC1 受体分布十分广泛, 脑、脑垂体、肾脏、肠、脾脏、鳃、心脏、肌肉和鳃耙上均有表达。金鱼 VPAC1 受体也可与依赖于 cAMP 的信号通路耦联, 与 PACAP 38 和 VIP 均有很高亲和力^[33]。在金鱼, VIP 通过激活 VPAC1 受体

来刺激 cAMP 合成的效能比 PACAP 38 至少高 100 多倍, 提示鱼类 VPAC1 受体对 VIP 刺激更为敏感, 而在哺乳类, PACAP 和 VIP 在这方面通常具有同等效能。

与哺乳类 VPAC2 受体结构类似的 G 蛋白耦联受体在金鱼被克隆, 该受体可被鱼类组氨酸-异亮氨酸(PHI)、哺乳类组氨酸-蛋氨酸和毒蜥蜴素选择性激活, 而对 PACAP 38 和 VIP 刺激不敏感; 另外, PHI (VPAC2) 受体在金鱼下丘脑、脑垂体、视顶盖和丘脑均有高水平表达。

4 鱼类 PACAP 的下丘脑促垂体激素功能

哺乳类不同组织中, 通过 Ca²⁺、Na⁺、AC 或磷酸肌醇等信号通路, PACAP 发挥着多种生理功能, 目前鱼类 PACAP 功能研究主要集中在下丘脑促垂体激素, 故下面主要介绍该领域取得的最新进展。

PACAP 是在寻找新的下丘脑促垂体激素时被发现的, 最初研究发现 PACAP 能影响 AC 活性和合成, 故开展了大量研究以揭示 PACAP 在调节垂体功能方面的作用。在哺乳类, PACAP 被视为新的下丘脑促垂体激素基于: ① 其核周体位于下丘脑; ② 正中隆起存在 PACAP 样神经纤维; ③ 垂体门脉血液中检测到 PACAP 免疫反应; ④ 可调节 GH、促黄体素(LH)、促滤泡素(FSH)、促乳激素(PRL) 和促肾上腺皮质激素(ACTH) 等分泌。但目前 PACAP 作为哺乳类垂体激素释放调节剂的功能未得到充分展示。

不同来源的 PACAP 均可刺激离体或在体鱼类脑垂体释放 GH。Sherwood 首次报道, PACAP 参与鱼类垂体激素(如 GH) 分泌调节。在金鱼, 两种形式的 PACAP 38(即 PACAP-38a 和 38b) 被克隆, 均可诱导金鱼和鲤^[34]脑垂体细胞 GH 分泌; 腹腔注射 PACAP 38a 和 38b, 也可升高金鱼血清 GH 水平。此外, 不同来源 PACAP 也可诱导金鱼、欧洲鳗鲡、草鱼和鲤脑垂体 GH 释放。

在金鱼, PACAP 拮抗剂 PACAP6 38 可抑制基础的和 PACAP 诱导的离体或在体脑垂体 GH 分泌; 而 VIP 对鲤、金鱼和欧洲鳗鲡 GH 分泌均无影响; 同时 VIP 拮抗剂对 PACAP 诱导的金鱼脑垂体 GH 分泌亦无抑制作用。可见, 在鱼类, PACAP 的 GH 释放作用是由 PAC1 受体介导的, 而不是 VPAC 受体, 尽管它们在脑垂体均有表达; 另外, VIP 和 VIP 拮抗剂对鱼类 GH 分泌的作用也提示, VPAC 受体未参与 PACAP 对鱼类 GH 释放的调节。

在金鱼和鲤, 生长激素抑制素(Somatostatin, SRIF 14)、5-羟色胺和去甲肾上腺素对 PACAP 诱导的 GH 释放起负调节作用; 当与 SRIF 14 共孵育时, PACAP 仍能刺激原代培养的大菱鲂脑垂体细胞释放 GH, 而 GHRHs、不同来源的促性腺激素释放激素(GnRHs) 和促甲状腺激素释放激素等则不行^[35]。可见, PACAP 可与鱼类 GH 分泌调节剂作用, 在脑垂体水平调节 GH 分泌。在鲤和金鱼, PACAP 对 GH 分泌的调节随生殖季节而变化; 性类固醇激素也参与了 PACAP 对鲤 GH 释放的调节。

Wong 等对 PACAP 调节金鱼脑垂体 GH 释放作用机理进行了深入研究(图 1), 在金鱼, PACAP GH 释放作用由脑垂体

PAC1 受体介导, AC/ cAMP/PKA 和 PLC/ IP₃/ PKC 信号通路至少部分参与 PACAP 对 GH 释放调节。Wong 等认为, 金鱼脑垂体细胞外 Ca²⁺ 通过 VSCC 内流和 CaMK II 进一步激活可能是 PACAP 激活 AC/ cAMP/PKA 和 PLC/ IP₃/ PKC 信号通路后发生的下游事件; 但不排除胞内储存 Ca²⁺ 的动员和释放在介导 PACAP GH 释放作用中也发挥一定作用, 这是因为在哺乳类, PACAP 可诱导 IP₃敏感的胞内钙库 Ca²⁺ 的动员。在

金鱼, PACAP 诱导的脑垂体细胞 GH 释放可被电压敏感 Na⁺ 通道阻断剂 TTX 抑制, 故 Wong 等推测, TTX 敏感 Na⁺ 通道的开放引起膜去极化, 并进而引起 VSCC 开放。作者对鲤的研究也证实, AC/ cAMP/ PKA 信号通路参与 PACAP 对脑垂体 GH 释放调节^[36]; PACAP 刺激鲤和草鱼脑垂体 GH 分泌作用的机理包括依赖于 cAMP 和依赖于 Ca²⁺ 的机制, 当然可能还存在其他机制。

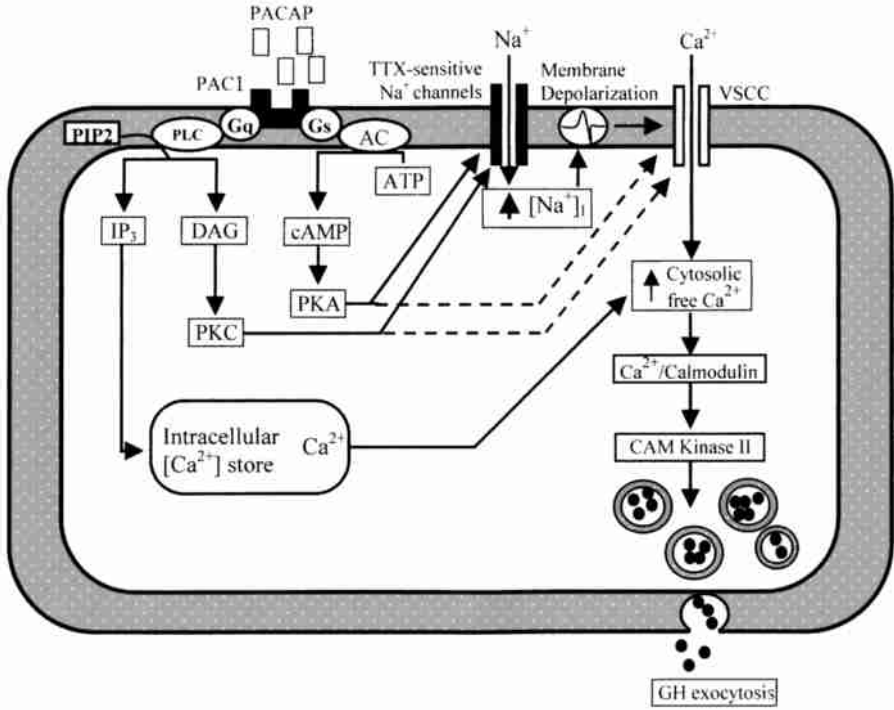


图 1 PACAP 介导鱼类脑垂体 GH 分泌的信号传导工作模式图

Fig. 1 A working model on signal transduction mechanisms mediating PACAP stimulated GH release from fish pituitary

PAC 1 receptor: PACAP I型受体(PACAP type I receptor); G: G 蛋白 (G protein); PLC: 磷脂酶 C (Phospholipase C); AC: 腺苷酸环化酶 (Adenylate cyclase); PIP2: 4,5 二磷酸脂酰肌醇 (Phosphatidylinositol biphosphate); IP₃: 1, 4, 5 三磷酸肌醇 (1, 4, 5 triphosphinositol); DAG: 甘油二酯 (Diacylglycerol); PKC: 蛋白激酶 C (Protein kinase C); ATP: 腺苷三磷酸 (Adenosine triphosphate); cAMP: 环腺苷酸 (Cyclic adenosine monophosphate); PKA: 蛋白激酶 A (Protein kinase A); VSCC: 电位敏感性 Ca²⁺ 通道 (Voltage sensitive Ca²⁺ channels); CAM: 钙调蛋白 (Calmodulin); CAMK II: 钙调蛋白依赖的激酶 II (CAM kinase II)

在哺乳类, PACAP 并不被看作是一种经典的生长激素释放因子, 而仅被认为是一种弱的或中等强度的垂体激素(如 GH) 释放调制剂; 在鱼类, PACAP 诱导鱼类 GH 释放的效能和 GH 反应的幅度与其他已知的鱼类 GH 分泌促进剂(如 GnRH、GHRH、神经肽 Y 和多巴胺等) 是相当的。综上所述, 鱼类(至少在鲤科鱼类) PACAP 是一种新的 GH 分泌促进剂, 它能在脑垂体水平调节 GH 分泌。

Mortero 等认为在脊椎动物系统发育的远缘类群中, PACAP 和 GHRH 在调节 GH 分泌的作用完全发生了转变, 在哺乳类, PACAP 和 GHRH 来源于不同前体, 在非哺乳类, PACAP 和 GHRH like 肽可由同一前体生成。在哺乳类, 含 GHRH 的神经原仅分布于下丘脑的漏斗核和背内侧核, 而产生 PACAP 的神经原广泛分布于下丘脑和非下丘脑区; 鱼类 PACAP 和 GHRH 免疫反应神经原仅局限于间脑, 并对腺垂体

行直接神经支配。在调节 GH 分泌方面, GHRH 在哺乳类和鸟类发挥主导作用, PACAP 和 GHRH 在两栖类发挥同等作用, PACAP 在鱼类具有很强促进 GH 分泌的效能, 而 GHRH 作用很弱或无。

PACAP 也可调节鱼类脑垂体 GH 合成。PACAP 38 可升高金鱼和草鱼脑垂体细胞 GH mRNA 水平, 该作用可被 PKA 抑制剂 H89 阻断, 说明 PACAP 对 GH 合成的作用也由 AC/ cAMP/ PKA 信号通路介导。

此外, PACAP 也参与鱼类 GtH 合成和释放调节^[37, 38]。PACAP 可刺激金鱼和鲤脑垂体细胞或碎片分泌 GtH; 腹腔注射金鱼 PACAP 38a 和 38b 也可升高金鱼血清 GtH 水平。在金鱼, PACAP GtH 释放作用由 AC/ cAMP/ PKA 信号通路介导; 在罗非鱼, PACAP 对 GtH 基因表达的刺激作用是 PKA 和 PKC 信号通路介导的。在鱼类, PACAP 是否还可影响其他垂体激

素(如 PRL 和 ACTH 等)的释放, 还未见报道。

5 小结与展望

自 1989 年首次分离到 PACAP, 在哺乳类, PACAP 已被证明是具有广泛组织分布和多种生理功能的活性多肽。目前对 PACAP 在低等脊椎动物中的生理作用认识还不很清楚, 但现有证据已表明, 在鱼类, PACAP 是一种下丘脑促垂体激素。鱼类 PACAP 分子结构与已报道的其他脊椎动物 PACAP 具有很高的同源性, 鱼类 PACAP 基因组成与哺乳类的十分相似, 只是鱼类 PACAP 激素原前体中含有鱼类 GHRH 的氨基酸序列, 鱼类 PACAP 组织分布也十分广泛; PACAP 作为鱼类神经内分泌激素, 参与脑垂体 GH 释放调节, 该作用由脑垂体 PAC 1 受体介导, AC/cAMP/PKA 或 PLC/IP₃/PKC 信号通路至少部分参与了 PACAP 对 GH 释放的调节, 上述信号通路可通过促进细胞外 Ca²⁺ 通过 VSCC 内流, 并进而激活 CaMK II 来调节 GH 释放。

目前, 鱼类脑垂体已鉴定有 PACAP 神经纤维和受体的存在和表达, 说明 PACAP 也可能由鱼类脑垂体局部合成并发挥作用, 所以, PACAP 在鱼类作为自分泌和旁分泌因子的作用值得深入探讨。

为有助于认识 PACAP 对鱼类 GH 分泌的调节机理, 并为深入研究提供线索, 结合本实验室在鲤鱼和其他实验室在金鱼和草鱼等上的研究, 用图 1 示意目前 PACAP 对脑垂体 GH 分泌的神经内分泌调控机理。

参考文献:

- [1] Arimura A. Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine and nervous systems[J]. *Japanese Journal of Physiology*, 1998, **48**: 301—331
- [2] Vincze E, Kovacs K. Structure, localization and physiologic role of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) [J]. *Orv. Hetil*, 2001, **142**(10): 491—496
- [3] Wong A O, Li W S, Lee E K, *et al.* Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide as a novel hypophysiotropic factor in fish[J]. *Biochem. Cell. Biol.*, 2000, **78**(3): 329—343
- [4] Delgado E, Wei Y, Martin S C, *et al.* Cloning and characterization of PACAP peptides in zebrafish[R]. Program and abstracts, 10th International Congress of Endocrinology; 1996; June 12—16, San Francisco
- [5] Matsuda K, Takel Y, Katoh J, *et al.* Isolation and structural characterization of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-like peptide from the brain of a teleost, stargazer, *Uranoscopus japonicus*[J]. *Peptides*, 1997, **18**: 723—727
- [6] Parker D B, Coe I R, Dison G H, *et al.* Two salmon neuropeptides encoded by one brain cDNA are structurally related to members of the glucagon superfamily[J]. *Eur. J. Biochem.*, 1993, **215**: 439—448
- [7] Parker D B, Power M E, Swanson P, *et al.* Exon skipping in the gene encoding pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in salmon alters the expression of two hormones that stimulate growth hormone release[J]. *Endocrinology*, 1997, **138**: 414—423

- [8] Kwon H B, Joss J M P, Ishii S. Recent Progress in Molecular and Comparative Endocrinology[M]. Chonnam: HRC Press. 1999. 383—388
- [9] McRory J E, Parker D B, Ngamvongchon S, *et al.* Sequence and expression of cDNA for Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and growth hormone releasing hormone (GHRH)-like peptide in catfish[J]. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1995, **108S**: 167—177
- [10] Fradinger E A, Sherwood N M. Characterization of the gene encoding both growth hormone releasing hormone (GRF) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the zebrafish[J]. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2000, **165**(1—2): 211—219
- [11] Kneuckl S L, Sherwood N M. Developmental expression, alternative splicing and gene copy number for the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and growth hormone releasing hormone (GRF) gene in rainbow trout [J]. *Mol. Cell Endocrinol.*, 2001, **182**(1): 99—108
- [12] Small B C, Nonneman D. Sequence and expression of a cDNA encoding both pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and growth hormone releasing hormone-like peptide in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 2001, **122**(3): 354—363
- [13] Montero M, Yon L, Kikuyama S, *et al.* Molecular evolution of the growth hormone releasing hormone/ pituitary adenylate cyclase activating polypeptide gene family: Functional implication in the regulation of growth hormone secretion[J]. *J. Mol. Endocrinol.*, 2000, **25**(2): 157—168
- [14] Wray V, Nohikara K, Naruse S. Solution structure comparison of the VIP/PACAP family of peptides by NMR spectroscopy[J]. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1998, **865**: 37—44
- [15] Chartrel N, Tonon M. C, Vaudry H, *et al.* Primary structure of frog pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and effects of ovine PACAP on frog pituitary[J]. *Endocrinology*, 1991, **129**: 3367—3371
- [16] Yasuhara T, Mizuno K, Somogyvari Vigh A, *et al.* Isolation and primary structure of chicken PACAP[J]. *Regul. pept.*, 1992, **37**: 326
- [17] Matsuda K, Yoshida T, Nagano Y, *et al.* Purification and primary structure of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) from the brain of an elasmobranch, stingray, *Dasyatis akarjii*[J]. *Peptides*, 1998, **19**(9): 1489—1495
- [18] Sherwood N M, Hew C L. Fish physiology, Vol. XIII, Molecular Endocrinology of Fish [M]. New York: Academic Press. 1994. 3—66
- [19] McRory J, Sherwood N M. Two protochordate genes encode pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and related family members [J]. *Endocrinology*, 1997, **138**: 2380—2390
- [20] McRory J E, Parker R L, Sherwood N M. Expression and alternative processing of a chicken gene encoding both growth hormone releasing hormone and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide [J]. *DNA Cell Biol.*, 1997, **16**(1): 95—102
- [21] Montero M, Yon L, Rousseau K, *et al.* Distribution, characterization, and growth hormone releasing activity of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the European eel, *Anguilla anguilla*[J]. *Endocrinology*, 1998, **139**: 4300—4310
- [22] Wong A O L, Leung M Y, Shea W L C, *et al.* Hypophysiotropic Ac-

- tion of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the goldfish: immunohistochemical demonstration of PACAP in the pituitary, PACAP stimulation of growth hormone release from pituitary cells, and molecular cloning of pituitary type I PACAP Receptor [J]. *Endocrinology*, 1998, **139**: 3465—3479
- [23] Matsuda K, Shioda S, Arimura A, *et al.* The study of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-like immunoreactivity in the brain of a teleost, stargazer, *Uranoscopus japonicus* [J]. *Zool. Sci.*, 1997, **14**: 645—650
- [24] Matsuda K, Itoh Y, Yoshida T, *et al.* The localization of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-like immunoreactivity in the hypothalamo-pituitary region of an elasmobranch, stingray, *Dasyatis akajei* [J]. *Peptides*, 1998, **19**(7): 1263—1267
- [25] Jonsson AC. Galanin, VIP, and PACAP-like nerves in the Brockmann body of the cod *Gadus morhua* and the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* innervate the insulin and glucagon containing cells [J]. *Neth. J. Zool.*, 1995, **45**: 132—134
- [26] Olsson C, Holmgren S. The control of gut motility [J]. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 2001, **128**(3): 479—501
- [27] De Girolamo P, Arcamone N, Rosica A, *et al.* PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide)-like immunoreactivity in the gill arch of the goldfish, *Carassius auratus*: distribution and comparison with VIP [J]. *Cell. Tissue. Res.*, 1998, **293**(3): 567—571
- [28] Reid S G, Fritsche R, Jonsson AC. Immunohistochemical localization of bioactive peptides and amines associated with the chromaffin tissue of five species of fish [J]. *Cell. Tissue. Res.*, 1995, **280**(3): 499—512
- [29] Montpetit C J, Perry S F. Vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide mediated control of catecholamine release from chromaffin tissue in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *J. Endocrinol.*, 2000, **166**(3): 705—714
- [30] Matsuda K, Kashimoto K, Higuchi T, *et al.* Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its relaxant activity in the rectum of a teleost, the stargazer, *Uranoscopus japonicus* [J]. *Peptides*, 2000, **21**(6): 821—827
- [31] Wei Y, Martin S C, Heinrich G, *et al.* Cloning and functional characterization of PACAP specific receptors in zebrafish [J]. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 1998, **865**: 45—48
- [32] Chow B K C, Yuen T T H, Chan K W. Molecular evolution of vertebrate VIP receptors and functional characterization of a VIP receptor from goldfish, *Carassius auratus* [J]. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1997, **105**: 176—185
- [33] Chow B K C. The goldfish vasoactive intestinal polypeptide receptor: Functional studies and tissue distribution [J]. *Fish. Physiol. Biochem.*, 1997, **17**: 213—222
- [34] Xiao D, Chu M M, Lee E K, *et al.* Regulation of growth hormone release in common carp pituitary cells by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: Signal transduction involves cAMP and calcium dependent mechanisms [J]. *Neuroendocrinology*, 2002, **76**(5): 325—338
- [35] Rousseau K, Le Belle N, Pichavant K, *et al.* Pituitary growth hormone secretion in the turbot, a phylogenetically recent teleost, is regulated by a species specific pattern of neuropeptides [J]. *Neuroendocrinology*, 2001, **74**(6): 375—385
- [36] Xiao D, Chu M M, Lee E K, *et al.* Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on intracellular cAMP and Ca^{2+} levels in common carp (*Cyprinus carpio*) pituitary cells *in vitro* [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2002, **34**(60): 790—795.
- [肖 东, 朱美诗, 李继仁, 等. 垂体腺苷酸环化酶激活多肽对鲤鱼脑垂体细胞内 cAMP 和胞内 Ca^{2+} 的影响. 生物化学与生物物理学报, 2002, **34**(6): 790—795]
- [37] Chang J P, Wirachowsky N R, Kwong P, *et al.* PACAP stimulation of gonadotropin II secretion in goldfish pituitary cells: mechanisms of action and interaction with gonadotropin releasing hormone signaling [J]. *J. Neuroendocrinol.*, 2001, **13**(6): 540—550
- [38] Gur G, Bonfil D, Safarian H, *et al.* Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and neuropeptide Y regulation of gonadotropin subunit gene expression in tilapia: role of PKC, PKA and ERK [J]. *Neuroendocrinology*. 2002, **75**(3): 164—174