

鲫鱼尾垂体抽提液对鳊鱼 离体肠段的收缩效应*

徐根兴 朱洪文

(南京大学生物系)

提要 鲫鱼尾垂体抽提液,可引起鳊鱼离体肠段或肠段纵行肌的节律性收缩。它的收缩效应具高度敏感性并和剂量相关。每毫升浸液 0.05 个尾垂体就能引起可重复的收缩反应。因此,我们建议用分离的鳊鱼肠段来取代鲢鳙鱼的直肠,以建立尾垂体紧张素 II 的生物测定方法。乙酰胆碱可作为实验室参考标准。

主题词 尾垂体、鲫鱼、鳊鱼、收缩效应、肠

鱼类尾部神经分泌系统是一个典型的神经内分泌结构,国外许多研究者从形态、功能以及内含物的分离、纯化等方面作了大量的工作。目前认为,鱼类尾部神经分泌系统中至少存在四种活性肽,即尾垂体紧张素(Urotensins) I、II、III、IV^[1]。对于这些新神经肽的研究,目前已引起了不少科学工作者的重视。Lederis 等人认为,硬头鳊(*Salmo gairdneri*) 尾垂体抽提液可引起该鱼离体膀胱的节律性收缩^[2],并可引起该鱼肠段纵肌带的节律性收缩和鳊鱼血压的升高^[3]。现在国外大多用硬头鳊的离体膀胱和直肠以及鳊鱼的血压变化来测定尾垂体紧张素 II 的活力,并建立了生物测定方法。我国鲢鳙鱼仅在黑龙江省和新安江等少数地区才有,因属于冷水性鱼,在我国大部分地区难以养殖。由于国内尚未见到有关研究鱼类尾部神经分泌系统方面的报导,因此,我们在研究鲫鱼尾部神经分泌系统形态学的基础上,用鲫鱼尾垂体抽提液作用于国内十种常见鱼的肠段和膀胱,以期找到能取代鲢鳙鱼的生物测定材料。结果发现鲫鱼尾垂体抽提液可引起鳊鱼离体肠段的节律性收缩。这种收缩效应的敏感性、重复性和剂量相关性均较好。

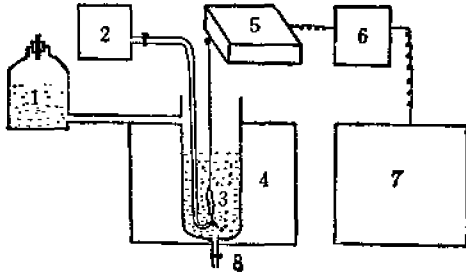
材 料 和 方 法

从市场购买的鳊鱼(*Siniperca chuatsi* B.), 体重为 1000—1500 克,雌雄均可,但以雄的为佳。在室温条件下养半小时以上,剖腹取出肠段,用 Ringer 液(配方为: NaCl 7.526 克, KCl 0.417 克, CaCl₂ 0.322 克, MgCl₂ 0.095 克, NaHCO₃ 0.193 克, KH₂PO₄ 0.122 克, 葡萄糖 2.91 克, 水 1000 毫升, pH 为 6.9)^[4] 冲洗掉肠中污物,取 2 厘米长的肠段套在一玻璃棒上,玻璃棒固定在实验台支架上,便于剥制纵行肌。用不锈钢镊子把肠段的表层

* 本研究为中国科学院科学基金资助课题,曾得到朱德熙教授和杜坤大老师的指导和帮助。陶旭和刘建宁参与部分实验工作,特此致谢。

(1) 四川省水产学会,1980。淡水鱼类养殖——科技文献资料选辑(下册)。

纵行肌与环行肌分离。其方法与豚鼠回肠纵行肌的剥制方法相仿。但该鱼的纵行肌很薄，肌纤维易断裂，因此剥离时要十分仔细。分离出的纵行肌似一薄纸。把纵行肌或肠段的一端用线扎紧，系在张力换能器上，放大器与换能器(为上海第一医学院制造)相连后，接到 XWC-100/A 型自动平衡记录仪上，肠段或肠段纵行肌的另一端系在钩子上，然后把肠段或肠段纵行肌置于有 20 毫升 Ringer 液的浴槽中(室温)，并持续通空气或氧气(图 1)。



图版说明

图 1 鳊鱼离体肠段收缩装置示意图

1. Ringer 液, 2. 贮气袋, 3. 离体肠段标本, 4. 离体器官浴槽, 5. 张力换能器,
6. 放大器, 7. 自动平衡记录仪, 8. 排液管

FIG. 1 Diagram showing the set-up of contractions of the isolated mandarin fish intestine.

1. Ringer's solution. 2. oxygen or air bag. 3. isolated mandarin fish intestine.
4. organ bath. 5. transducer. 6. amplifier. 7. recorder. 8. drain pipe.

把鲫鱼(*Carassius auratus* L.)的尾垂体以及和它相连的一小段脊髓一起剖出(以下仅称尾垂体),立即放入冷丙酮中脱水、干燥、剪碎、研钵研磨。用 0.25% 醋酸抽提, 3500 转/分离心 15 分钟,上清液用 BÜCHI 旋转蒸发器蒸干,用 Ringer 液溶解。另取靠近头部的脊髓作同样处理,作为对照。氯化乙酰胆碱(ACh)也用 Ringer 液配制作为参考标准。尾垂体抽提液或 ACh 加在放有离体肠段的浴槽中,待收缩反应 2—30 分钟后,再用 Ringer 液反复洗 4—5 次,当收缩曲线恢复至正常后再重复作第二次收缩试验。鲫鱼尾垂体抽提液和氯化乙酰胆碱对肠段或肠段纵行肌的作用均用“2×2”四点分析法进行测试。

结果和讨论

鳊鱼肠段对鲫鱼尾垂体抽提液有很高的敏感性,最低效应浓度是每毫升浸液 0.05 个醋酸抽提尾垂体。肠段对 ACh 的反应是在毫微克水平。最低效应浓度为每毫升浸液 5—50 毫微克。每毫升浸液 0.75 个尾垂体相当于每毫升浸液 15 毫微克 ACh 的效应。与 ACh 的效应比较,肠段对鲫鱼尾垂体抽提液的反应开始时较慢,一般要 1—2 分钟后才出现反应,有时要 10 分钟后才出现最大效应,但反应的持续时间长(图 3),而肠段对 ACh 的反应一开始就迅速达到最大值(图 4)。肠段虽存在自律性收缩,但这种自律性收缩是间断性的,反应强度不大,并且每次收缩都回到基线(图 2)。而肠段对 ACh 和鲫鱼尾垂

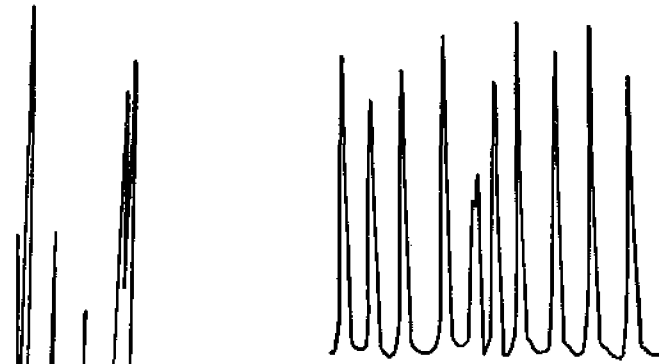


图2 鳊鱼肠段的自律性收缩。

FIG. 2 Spontaneous contraction rhythms of the isolated mandarin fish intestine.



图3 鲫鱼尾垂体抽提液引起的鳊鱼离体肠段的收缩反应曲线。箭头指示加样点。
(每毫升浸液 0.75 个尾垂体)

FIG. 3 Tracings of responses of the isolated mandarin fish intestine to crucian carp urophysis extracts. Extracts added at arrow. (0.75 urophysis/ml bath fluid).

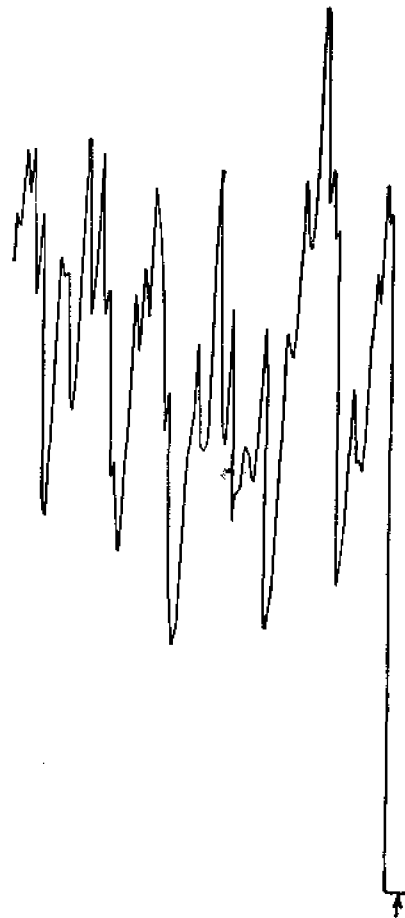


图4 氯化乙酰胆碱引起的鳊鱼离体肠段的收缩反应曲线。箭头指示加样点。(每毫升浸液 15 毫微克 ACh)

FIG. 4 Tracings of responses of the isolated mandarin fish intestine to acetylcholine (ACh). ACh added at arrow. (15 mug/ml bath fluid).

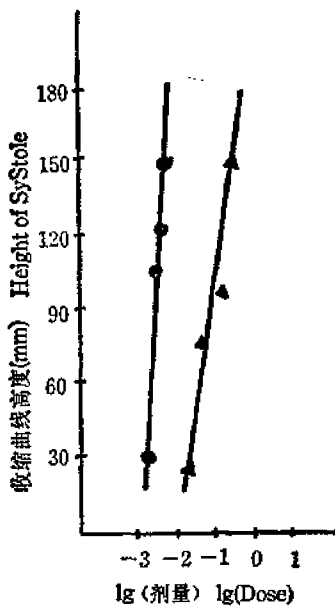


图5 鳊鱼肠段收缩反应的 log 剂量相关图。○—○, 氯化乙酰胆碱的剂量相关反应。▲—▲, 鲫鱼尾垂体抽提液的剂量相关反应。

FIG. 5 Log dose-response slopes of contraction responses of the isolated mandarin fish intestines to ACh and crucian carp urophysis extracts. ○—○, ACh. ▲—▲, crucian carp urophysis extracts.

体抽提液的反应是一种连续的、不回到基线的持续收缩, 收缩强度较大, 收缩频率较快(图 3.4)。这就易同肠段自律性收缩相区分。在“2×2”四点分析中, 肠段和肠段纵行肌对尾垂体抽提液和 ACh 的反应均呈良好的 Log 剂量相关反应(图 5)。肠段纵行肌自律性收缩强度比肠段小, 且反应敏感性不及肠段, 它的最小效应浓度为每毫升浸液 67 毫微克 ACh 和每毫升浸液 0.1—0.5 个醋酸抽提尾垂体, 这可能是由于剥制时纵行肌受损所致。在室温(最好保持在 12—18°C) 浸液中持续通空气的情况下, 肠段对尾垂体抽提液和 ACh 的敏感性可保持 4—5 小时以上, 当持续通氧气时, 则可达 10 小时以上, 并且在这段时间内, 只要每次给予充分养息, 使收缩曲线恢复至正常, 这样, 反应将一直呈现出同 Log 剂量的相关性, 而不出现突然减敏的现象。用靠近头部的脊髓醋酸抽提液和 Ringer 液作对照试验, 两者均不引起鳊鱼离体肠段的收缩效应。目前已经知道, 鲫鱼尾部神经分泌细胞仅分布在相当于最后 12 个脊椎骨位置的脊髓(尾部脊髓)中, 它们的轴突延伸入尾垂体中^[4]。在其它部分的脊髓中不含神经分泌细胞。因此可以认为, 引起鳊鱼离体肠段收缩的物质是尾部神经分泌系统所特有的, 一般认为, 这类物质是神经分泌细胞分泌后, 通过轴突运输并贮存在尾垂体中的^[2]。

Clark 等^[4]用硬头鳊直肠收缩的生物测定方法成功地从一种鰕虎鱼 (*Gillichthys mirabilis*) 中分离出了尾垂体紧张素 II。Munekata 等^[5]也从鲤鱼中分离出 3 种类型的尾垂体紧张素 II。现已知道, 尾垂体紧张素 II 在不同鱼中具有多型性^[6], 这已引起了不少研究者的兴趣。目前认为, 尾垂体紧张素 II 对鱼类平滑肌的收缩作用不受其它尾垂体活性物质的影响^[8], 用丙酮处理过的尾垂体中不含组胺和乙酰胆碱, 因为这些物质溶于丙酮^[6]。Berlind 曾报导过, 一种鰕虎鱼尾垂体的提取物可引起该鱼的离体输精管收缩^[11]。Lederis 认为, 尾垂体抽提液可引起虹鳟 (*Lebistes reticulatus*) 的子宫和输卵管收缩^[9]。现在推测, 这可能都是尾垂体紧张素 II 所引起的作用^[10]。我们曾观察到, 在人工催产前团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 尾部神经分泌系统的超微结构有变化^[4]。许多研究表明, 尾垂体紧张素 II 与渗透压调节和生殖作用等有关^[9, 10], 但它的确切作用仍不甚清楚。目前国外常用硬头鳊鱼肠段和膀胱的收缩反应来作为尾垂体紧张素 II 的生物测定方法, 以便进行分离、提纯及功能方面的进一步研究。由于我国大部分地区鲢鳊鱼来源

(1) 朱洪文、徐根兴。鲫鱼尾部神经分泌系统的显微和亚显微结构及其季节性变化。动物学报(待发表)。

(2) 同上。

困难，所以我们从鲫鱼、鲤鱼、乌鳢、塘鳢、黄鲮鱼、鲢鱼、黄鲢、泥鳅、鳊鱼和鳊鱼等十种常见鱼的肠段和膀胱试验中进行筛选。结果表明，鳊鱼肠段对尾垂体抽提液最为敏感，但它的膀胱敏感性较差，其它九种鱼的肠段和膀胱敏感性也都很差。一般认为，尾垂体紧张素 II 对所有鱼的平滑肌均有效应^[10]，但我们的实验表明，各种鱼对尾垂体紧张素 II 的敏感性不尽相同，例如鲤鱼和鲫鱼的肠很长，它们的自律性收缩和对鲫鱼尾垂体抽提液以及 ACh 的反应均很低。

国外常用硬头鳟膀胱的每分钟收缩次数来表示尾垂体紧张素 II 的活性^[8]。但鳊鱼肠段每分钟收缩次数并不和剂量呈相关反应，而收缩强度则呈良好的 Log 剂量相关反应。通过“2×2”四点分析，鳊鱼肠段对醋酸抽提尾垂体的收缩反应的回归方程为 $y = 84.20x + 144.17$ (相关系数 $r = 0.956$)，氯化乙酰胆碱反应的回归方程为 $y = 253.42x + 617.48$ ($r = 0.986$)。所有的 Log 剂量相关反应均显示明显的线性回归 ($P < 0.05$)，而相关系数间没有明显差异 ($P > 0.05$)。我们以鳊鱼肠段或肠段纵行肌引起的收缩强度来表示鲫鱼尾垂体抽提液的活性。

国外都用一种鰕虎鱼尾垂体的醋酸抽提液作为实验室标准，以与其它鱼的尾垂体抽提液的效应作比较，已建立了一个国际活力单位。但我国没有这种鰕虎鱼。国外曾对 ACh 和鰕虎鱼尾垂体抽提液的效应作过比较，并且我们的实验表明，ACh 的效应也是高度敏感和剂量相关的，并具有良好的重复性。因此我们建议用 ACh 作实验室参考标准，用鳊鱼肠段来代替鲑鳟鱼的直肠和膀胱，以建立一个国内可行的尾垂体紧张素 II 的生物测定方法，有利于国内开展这一方面的工作。但要作为一种生物测定方法，最好再用一些阻断剂、促进剂等进一步试验反应的专一性，并需在分离、提纯尾垂体紧张素 II 的过程中加以检验，这还需做大量的工作。

参 考 文 献

- [1] 徐根兴、朱洪文, 1986. 团头鲂尾部神经分泌系统的超微结构及其在人工催产过程中的变化. *水产学报*, 10(2): 205—211.
- [2] Lederis, K., 1970. Teleost urophysis II. Biological characterization of the bladder-contracting activity. *Gen Comp. Endocrinol.* 14: 417—426.
- [3] Zelnik, P. R. et al., 1973. Chromatographic separation of urotensins. *Gen. Comp. Endocrinol.* 20: 392—400.
- [4] Clark, B. R. et al., 1982. Chemical synthesis of urotensin II, a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Int. J. Pept. Protein Res.* 19: 448—453.
- [5] Munekata, E. et al., 1981. Isolation, characterization, and synthesis of urotensin II peptides. *Pept. Synth., Struct., Funct., Proc. Am. Pept. Symp.*, 7th, 69—72. edited by D. H. Rich and E. Gross. Rockford, IL: *Pierce Chemical*.
- [6] Kobayashi, H. et al., 1968. Vasodepressor substance in fish urophysis. *Annot. Zool Jap.* 41: 154—158.
- [7] Berlind, A., 1972. Teleost caudal neurosecretory system: Sperm duct contraction induced by urophysal material. *J. Endocrinol.* 52: 567—574.
- [8] Lederis, K., 1970. Active substances in the caudal neurosecretory system of bony fishes. *Mem. Soc. Endocr.* 18: 465—484.
- [9] Lederis, K., 1973. Current studies on urotensins. *Amer. Zool.* 13: 771—773.
- [10] Chan, D. K. O. et al. 1976. The caudal neurosecretory system: a critical evaluation of the two-hormone hypothesis. *Cell. Tissue. Res.*, 174: 339—354.

EXTRACTS OF UROPHYSIS OF CRUCIAN CARP INDUCING CONTRACTION EFFECT ON THE INTESTINES OF MANDARIN FISH IN VITRO

Xu Genxing and Zhu Hongwen

(*Department of Biology, Nanjing University*)

ABSTRACT Extracts of urophysis of crucian carp (*Carassius auratus* L.) induced rhythmic contractions of the intestines of mandarin fish (*Siniperca chuatsi* B.) in vitro. The contraction effect of the extracts showed a high degree of sensitivity and good reproducibility. The experiments was found to be dose-dependent. Reproducible responses were obtained with as little as 0.05 of a urophysis/ml in fluid bath. It was suggested that the isolated mandarin fish intestines could be used to substitute for trout rectum in order to provide the bioassay method for the estimation of urotesin II. Acetylcholine was used for a laboratory reference standard.

KEY WORD Urophysis, Crucian carp, Mandarin fish, Contraction effect, Intestines