

细胞外 Ca^{2+} 和 K^+ 对鲤鱼脑垂体 离体生长激素分泌的影响*

林信伟 林浩然

(中山大学生物系, 广州 510275)

提 要 采用脑垂体离体灌流孵育系统, 研究细胞外 Ca^{2+} 和 K^+ 对鲤鱼脑垂体基础的和鲑鱼促性腺激素释放激素(sGnRH)刺激的生长激素(GH)分泌的影响。离体灌流孵育的鲤鱼脑垂体基础 GH 分泌和 sGnRH 刺激的 GH 分泌都是细胞外 Ca^{2+} 依赖的, 缺细胞外 Ca^{2+} 存在时, 基础 GH 分泌显著下降, 2 分钟脉冲式 sGnRH 刺激的 GH 分泌反应接近消失。 Ca^{2+} 通道阻滞剂异搏定以剂量依存形式显著抑制基础和 2 分钟脉冲式 sGnRH 刺激的 GH 分泌, 表明细胞外 Ca^{2+} 的作用至少部分通过细胞膜电位敏感性 Ca^{2+} 通道。50mM K^+ 显著刺激基础 GH 分泌, 并显著加强高剂量 sGnRH 刺激的 GH 分泌, 且 K^+ 的作用是细胞外 Ca^{2+} 依赖的。

关键词 鲑鱼促性腺激素释放激素, 生长激素, 钙离子, 钾离子, 离体灌流孵育, 鲤鱼

脊椎动物脑垂体生长激素(GH)分泌调节机理的证据主要来自哺乳类和鸟类的研究结果^[2,10], 在硬骨鱼类中, 有关 GH 分泌调节机理的研究报道甚少。在哺乳类和鸟类, 刺激脑垂体 GH 分泌的下丘脑神经肽主要包括 GH 释放激素(GHRH)和促甲状腺激素释放激素(TRH), 这些神经肽刺激 GH 分泌的受体后机理包括 Ca^{2+} 参与的第二信使系统^[2,7,11]。但是, 在硬骨鱼类, 调节 GH 分泌的下丘脑释放因子的分布、性质和功能目前尚未确定^[3,15]。最近, 在金鱼和鲤鱼中研究结果证明促性腺激素释放激素(GnRH)可做为 GH 释放因子刺激离体和在体的脑垂体 GH 释放, 并且促进金鱼体长的增长^{[5,16](1)}。GnRH 对 GH 分泌的促进作用也在一些处于病理状态下的哺乳类以及离体孵育的正常兔脑垂体细胞中报道^[1,8], 但 GnRH 刺激 GH 分泌作用的机理目前还不清楚。Chang 和 Deleeuw (1990) 发现细胞外 Ca^{2+} 对金鱼脑垂体基础的和 GnRH 促进的 GH 分泌活动是必需的^[5]。本研究采用脑垂体碎片离体灌流孵育系统, 研究细胞外 Ca^{2+} 以及 Ca^{2+} 通道阻滞剂对鲤鱼离体脑垂体基础的和鲑鱼 GnRH(sGnRH) 刺激的 GH 分泌的影响, 并首次检查细胞外 K^+ 对鱼类 GH 分泌的影响。

材 料 与 方 法

1. 实验动物 性腺正在发育的鲤鱼(不分性别), 体重 420—627g, 购自广州农贸市

• 高等学校博士点科学基金资助的课题。

收稿年月: 1992 年 7 月; 同年 10 月修改。

(1) Lin, X. W. et al., 1992. Growth hormone and gonadotropin secretion in the common carp (*Cyprinus carpio* L.): *in vitro* interactions of gonadotropin-releasing hormones, somatostatin and the dopamine agonist apomorphine. *Gen. Comp. Endocrinol.*

场。性腺成熟系数为 $12.7 \pm 2.9\%$ (性腺重/体重)。实验前鲤鱼在室温和自然光周期下暂养于室内水族箱中。

2. 鲤鱼脑垂体碎片的离体灌流孵育 鲤鱼脑垂体碎片离体灌流孵育系统参照金鱼脑垂体碎片的离体灌流孵育系统^[6,14],仅稍做修改。鲤鱼断头放血后,取出脑垂体制成碎片($<1\text{mm}^2$),将每份相当于半个脑垂体的碎片分别转移到 0.3ml 柱状灌流孵育室中,并置碎片于两层 Cytodex 微载体之间。脑垂体碎片先用 199 培养液(含 Hanks 盐溶液、 25mM HEPES 和 15u/ml 制霉菌素)预灌流过夜(8—10hr, 5ml/hr)。实验前 2hr,将 199 培养液换成 Hanks 平衡盐溶液(含 25mM HEPES 和 0.1% 牛血清白蛋白)(简称 HBSS)或无钙的 HBSS(实验一),并增加流速至 15ml/hr 。灌流孵育温度为 $19 \pm 1^\circ\text{C}$,收集 5 分钟一管的收集液(样品),样品贮于 -28°C 待测。

3. 实验设计

(1) 实验一 不同浓度细胞外 Ca^{2+} 对基础和 sGnRH 刺激的 GH 分泌的影响。实验前 2hr 用无钙的 HBSS 代替 199 培养液继续灌流 2hr 后,四个灌流柱分别用含 10mM 、 1mM 、 0.1mM 和 0.01mM Ca^{2+} 的 HBSS 灌流 4hr,从第二小时起间隔 1hr 引入三个 2 分钟不同剂量(1、10 和 100nM)的 sGnRH 刺激。重复四次实验,其中两次实验中三种剂量 sGnRH 以增加浓度顺序引入;另两次则以减小浓度顺序引入。无钙的 HBSS 为缺 CaCl_2 的 HBSS,另加入 $100\mu\text{M}$ 乙二醇二(β -氨基乙醚)四乙酸[Ethylene-glycol-bis-(β -Aminethylether),N,N,N',N',Tetraacetic Acid, EGTA];含不同浓度 Ca^{2+} 的 HBSS 为缺 CaCl_2 的 HBSS 分别加入不同浓度 CaCl_2 。sGnRH 由美国加州 Salk 研究所 J. Rivier 和 W. Vale 合成并赠送。sGnRH 用 HBSS 配成 $10\mu\text{M}$ 贮存液,实验时用各自灌流柱的灌流液稀释至所需浓度。

(2) 实验二 Ca^{2+} 通道阻滞剂异搏定 (Verapamil, VER) 对基础和 sGnRH 刺激的 GH 分泌的影响。预灌流后四个灌流柱的脑垂体碎片分别用 HBSS 以及含 $0.1\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 和 $10\mu\text{M}$ VER 的 HBSS 灌流 3.5hr。在灌流 0.5hr 后,以 1hr 间隔引入三个 2 分钟不同剂量(1、10 和 100nM)的 sGnRH 刺激。重复四次实验。sGnRH 来源及引入方式同实验一。VER 用二甲亚砜配制成 10mM 溶液,再用 HBSS 稀释成所需浓度。

(3) 实验三 高浓度 K^+ (50mM) 对基础和 sGnRH 刺激的 GH 分泌的影响。预灌流后四个灌流柱的脑垂体碎片分别用 HBSS、含 50mM K^+ 的 HBSS(高 K^+ HBSS)、高 K^+ 无钙 HBSS 和无钙 HBSS 灌流 4hr。从第二小时起,以 1hr 间隔引入三个 2 分钟不同剂量(1、10 和 100nM)的 sGnRH 刺激。重复四次实验, sGnRH 来源及引入方式同前。高 K^+ HBSS 为含 50mM KCl 的 HBSS,其中 NaCl 浓度随 KCl 增加而相应减少,以维持稳定的离子浓度。高 K^+ 无 Ca^{2+} HBSS 为缺 CaCl_2 的 HBSS,另加入 $100\mu\text{M}$ EGTA 并提高 K^+ 浓度至 50mM 。无钙 HBSS 同前。

4. 激素测定和统计分析方法 样品中 GH 含量测定采用鲤鱼 GH 为标记抗原和标准的 GH 放射免疫测定法^[16]。脑垂体碎片对脉冲式(2 分钟) sGnRH 刺激的 GH 分泌反应的计算参照 Habibi 等(1989)^[9],即把每个刺激前的三管样品(15 分钟)的 GH 含量的平均值做为平均刺激前基础分泌值(prepulse),把脑垂体对脉冲式刺激的 GH 分泌反应定量为 30 分钟内 GH 分泌反应值之和,然后将此值转换为各自刺激前基础分泌值

的百分数(% prepulse)。每组数据以平均值 \pm 标准差表示,显著性检验采用 Duncan 氏新复极差检验,当 $P < 0.05$ 时,认为差异显著。

实验结果

含不同浓度 Ca^{2+} 的 HBSS 对鲤鱼脑垂体碎片的基础 GH 分泌有明显影响(图 1, A)。在 0.01mM 到 1mM 范围,脑垂体基础 GH 分泌水平随 Ca^{2+} 浓度增加而增加;当 Ca^{2+} 浓度为 10mM 时, GH 分泌又显著下降,但仍显著高于低 Ca^{2+} 浓度(0.1和 0.01mM)时的 GH 水平。用无钙 HBSS 预灌流时的平均基础 GH 水平 ($25.2 \pm 12.9\text{ng/ml}$) 也显著低于用含 1mM Ca^{2+} 的 HBSS 灌流时的 GH 水平 ($115.5 \pm 26.7\text{ng/ml}$)。与基础 GH 水平变化相似,在 0.01mM 到 1mM Ca^{2+} 浓度范围内, Ca^{2+} 以剂量依存形式促进三种剂量脉冲式的 sGnRH 刺激的 GH 分泌(图 1, B), 但当 Ca^{2+} 浓度为 10mM 时, sGnRH 刺激的 GH 分泌反应显著低于 1mM Ca^{2+} 存在时的 GH 分泌反应。

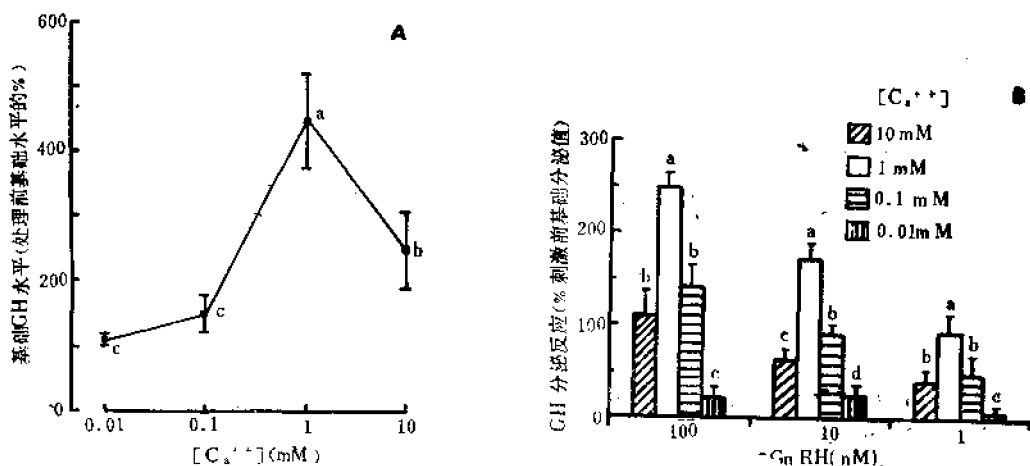


图 1 不同浓度细胞外 Ca^{2+} 对基础的(A)和 sGnRH 刺激的(B) GH 分泌的影响。图中平均值上标有相同的字母(a、b、c 或 d)表示这些平均值之间无显著差异

Fig. 1 Effects of extracellular Ca^{2+} concentrations on basal (A) and sGnRH-stimulated (B) GH secretion. The same letter above each mean indicates no significant difference

三种剂量 VER 以剂量依存形式显著抑制基础的和三种剂量脉冲式 sGnRH 刺激的 GH 分泌(图 2), 其中 10 μM VER 作用后的基础 GH 水平仅为作用前的约 50%; 在 10 μM 和 1 μM VER 存在下, sGnRH 刺激的 GH 分泌反应之间无显著差异。

含 50mM K^+ (高 K^+) 的 HBSS 灌流孵育的鲤鱼脑垂体碎片的基础 GH 分泌持续、显著地增加。灌流后第一和第二个 30 分钟的平均基础 GH 水平之间无显著差异, 且都显著高于对照(用正常 HBSS 灌流)。高 K^+ 无 Ca^{2+} 的 HBSS 灌流的基础 GH 分泌在第一个 30 分钟内有所增加, 但与同时的对照无显著差异; 第二个 30 分钟的平均基础 GH 水平显著低于对照以及第一个 30 分钟的平均基础 GH 水平。无 Ca^{2+} HBSS 灌流时的情况与高 K^+ 无 Ca^{2+} HBSS 灌流时相似, 基础 GH 水平在灌流后 30 分钟内无显著

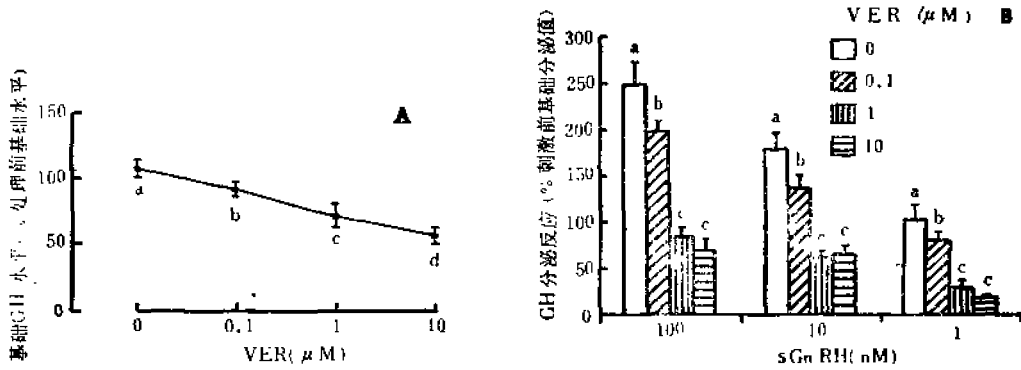


图2 电压敏感性 Ca^{2+} 通道阻滞剂异搏定(VER)对基础的(A)和 sGnRH刺激的(B) GH分泌的影响。a、b、c和d的说明见图1

Fig. 2 Effects of voltage-sensitive Ca^{2+} channel antagonist verapamil (VER) on basal (A) and sGnRH-stimulated (B) GH secretion. For explanations of a, b, c and d, see legend to Fig. 1

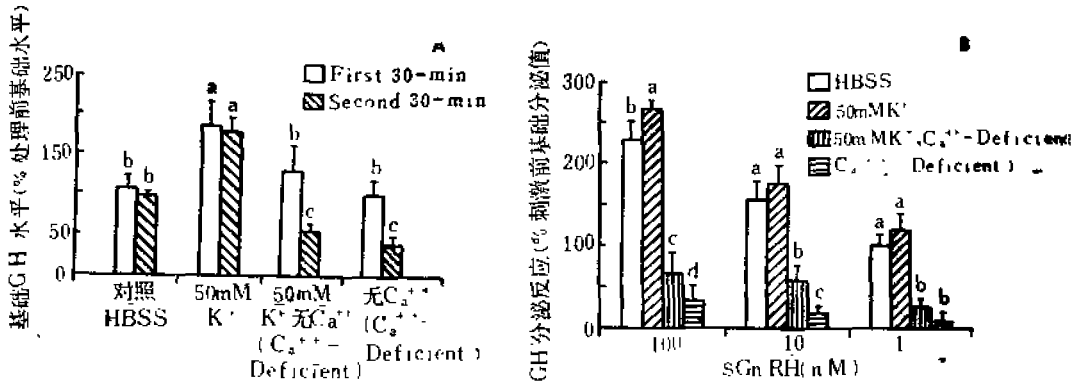


图3 高浓度 K^+ (50mM)对基础的(A)和 sGnRH 刺激的(B)GH分泌的影响, 图中 a、c、e和d的说明见图1

Fig. 3 Effects of elevated K^+ concentration (50mM) on basal (A) and sGnRH stimulated (B) GH secretion. For explanations of a, b, c and d, see legend to Fig. 1

变化, 但30分钟后显著下降, 且与同时间高 K^+ 无 Ca^{2+} HBSS 灌流时的 GH 水平相近 (图3,A)。

高 K^+ 对三种剂量脉冲式 sGnRH 刺激的 GH 分泌有一定的加强作用, 但仅在 100nM sGnRH 刺激的 GH 分泌反应组中, 高 K^+ 的作用是显著的。无 Ca^{2+} HBSS 和高 K^+ 无 Ca^{2+} HBSS 灌流孵育的脑垂体碎片对 sGnRH 刺激的 GH 分泌反应都显著低于对照, 且高 K^+ 无 Ca^{2+} HBSS 灌流时 GH 分泌反应又显著高于无 Ca^{2+} HBSS 灌流组 (在 100nM 和 10nM sGnRH 刺激下)。无 Ca^{2+} HBSS 灌流时, 脑垂体碎片对 sGnRH 刺激的 GH 分泌反应接近消失(图3,B)。

讨 论

本结果表明鲤鱼脑垂体基础 GH 分泌是细胞外 Ca^{2+} 依赖的, 无细胞外 Ca^{2+} 存在时, 基础 GH 分泌显著降低。在低于正常的细胞外 Ca^{2+} 浓度范围内, Ca^{2+} 以剂量依存形式促进基础 GH 分泌。在哺乳类, 许多研究证明基础 GH 分泌依赖于细胞外 Ca^{2+} [12, 17]。此外, 在鸟类和金鱼的离体研究也发现基础 GH 分泌随细胞外 Ca^{2+} 浓度变化而变化 [15, 9]。本研究中电压敏感性 Ca^{2+} 通道 (VSCC) 阻滞剂 VER 显著抑制鲤鱼脑垂体基础 GH 分泌, 证明细胞外 Ca^{2+} 对基础 GH 分泌的影响至少部分通过细胞膜 VSCC 的作用。Stojilkovic 等 (1988) 认为脑垂体细胞外 Ca^{2+} 依赖的基础 GH 分泌可能是 GH 分泌细胞上存在自动激活的 VSCC 以及依赖于细胞外 Ca^{2+} 、自动产生的动作电位的作用结果, 这种自动节律的电活动可提高细胞质 Ca^{2+} 浓度达到阈水平, 从而激活细胞内激素分泌机制 [18]。鲤鱼脑垂体基础 GH 分泌对细胞外 Ca^{2+} 的依赖性是否通过相同的机理尚需进一步研究。本研究中过高的细胞外 Ca^{2+} 环境不能进一步增加基础 GH 分泌, 此结果与鸟类和哺乳类的研究结果相似 [9, 17], 表明除了使细胞质 Ca^{2+} 浓度达到阈值所需的细胞外 Ca^{2+} 环境外, 过多的细胞外 Ca^{2+} 对基础 GH 分泌是无作用甚至有害的。高浓度 Ca^{2+} 可能影响细胞膜的电生理特性以及引起细胞的脱敏作用以防过多的 Ca^{2+} 内流 [19]。

哺乳类脑垂体 GH 分泌调节是依赖于 Ca^{2+} 的过程, 许多刺激 GH 分泌的神经肽, 如 GHRH、TRH 等的作用都通过 Ca^{2+} 参与的第二信使系统, 引起细胞的激素分泌反应 [7]。然而, GnRH 对哺乳类脑垂体 GH 分泌的刺激作用机理是否与 Ca^{2+} 有关尚不清楚。最近, 离体研究结果表明细胞外 Ca^{2+} 对金鱼脑垂体细胞基础的和 GnRH 促进的 GH 分泌是必需的 [5]。本结果也证明 sGnRH 对鲤鱼离体脑垂体 GH 分泌的刺激作用是细胞外 Ca^{2+} 依赖的, 并且细胞外 Ca^{2+} 的作用主要通过 VSCC, 以改变细胞内 Ca^{2+} 状态。因本结果中高剂量 VER 不能完全抑制 sGnRH 的作用, 所以可能存在其它性质的 Ca^{2+} 通道或非 Ca^{2+} 依赖的过程参与 sGnRH 作用机理。

高浓度 K^+ 对脑垂体 GH 分泌的影响在鱼类中尚未有报道。本结果表明 50mM K^+ 持续地刺激离体鲤鱼脑垂体基础 GH 分泌, 且高 K^+ 的作用是细胞外 Ca^{2+} 依赖的, 这与哺乳类的研究结果是一致的 [4, 17]。在哺乳类, 高 K^+ 促进脑垂体激素分泌的作用机理一般认为是高 K^+ 促进细胞膜去极化, 激活 VSCC, 增加细胞质 Ca^{2+} 浓度, 引起细胞激素分泌反应 [17]。在脊椎动物, 有关 K^+ 影响 GnRH 作用的报道甚少。Kao 等 (1977) 曾报道 10 分钟脉冲式高 K^+ (12.2mM) 可显著促进 GnRH 刺激的促黄体生成激素 (LH) 分泌 [10]。本结果表明高 K^+ 对 sGnRH 刺激的 GH 分泌的影响依赖于 sGnRH 剂量, 在高剂量下, 高 K^+ 对 sGnRH 的作用才有显著的加强作用, 其作用机理尚有待继续研究。

参 考 文 献

- [1] Amsterdam, J. D. et al., 1982. Growth hormone, prolactin and thyrotropin responses to gonadotropin-releasing hormone in depressed patients and healthy volunteers. *Psychoneuroendocrinology*, 7: 177-184
- [2] Arimura, A. and M. U. Cullar, 1985. Regulation of growth hormone secretion. in *The pituitary*

- gland*, H. Imura ed. pp221—258. Raven Press, New York.
- [3] Badger, J. M. *et al.*, 1987. Growth hormone secretion following gonadotropin-releasing hormone or bombesin administration in perfused rat pituitary cells. in *69th Annual Meeting of The Endocrine Society*, Indianapolis IN, 1987, p48 (abstract).
- [4] Chang, J. P. *et al.*, 1988. Gonadotropin-releasing hormone stimulates luteinizing hormone secretion by extracellular calcium-dependent and -independent mechanisms. *Endocrinology*, **123**: 87—97.
- [5] Chang, J. P. and B. Deleeuw, 1990. In vitro goldfish growth hormone responses to gonadotropin-releasing hormone: possible roles of extracellular calcium and arachidonic acid metabolism? *Gen. Comp. Endocrinol.*, **80**: 155—164.
- [6] Chang, J. P. *et al.*, 1990. Use of a pituitary cell dispersion method and primary culture system for the studies of gonadotropin-releasing hormone action in the goldfish, *Carassius auratus*. II. extracellular calcium dependence and dopaminergic inhibition of gonadotropin responses. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **77**: 274—282.
- [7] Frohman, L.A. and J.O.Jansson, 1986. Growth hormone releasing hormone. *Endocrine Rev.*, **7**:223—235.
- [8] Habibi, H. R. *et al.*, 1989. 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.*, **40**: 1152—1161.
- [9] Hall, T. R. *et al.*, 1985. Calcium control of growth hormone release from chicken pituitary glands in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **69**: 70—74.
- [10] —, 1986. Control of growth hormone secretion in the vertebrates: a comparative survey. *Comp. Biochem. Physiol.*, **84A**: 231—253.
- [11] Harvey, S., 1990. Thyrotropin-releasing hormone: a growth hormone releasing factor. *J. Endocrinol.*, **125**: 345—358.
- [12] Judd, A. M. *et al.*, 1986. Protein kinase C activators and calcium-mobilizing agents synergistically increase GH, LH, and TSH secretion from anterior pituitary cells. *Neuroendocrinology*, **42**: 197—202.
- [13] Kao, L. W. L. *et al.*, 1977. Response of the perfused anterior pituitaries of rats to synthetic gonadotropin-releasing hormone: a comparison with hypothalamic extract and demonstration of a role for potassium in the release of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone. *Endocrinology*, **101**: 1444—1454.
- [14] Mackenzie, D. S. *et al.*, 1984. Response of superfused goldfish pituitary fragments to mammalian and salmon gonadotropin-releasing hormone. *Life Sci.*, **35**: 2019—2023.
- [15] Marchant, T. A. and R. E. Peter, 1989. Hypothalamic peptides influencing growth hormone secretion in the goldfish. *Fish Physiol. Biochem.*, **7**: 133—139.
- [16] Marchant, T. A. *et al.*, 1989. Evidence that gonadotropin-releasing hormone also functions as a growth hormone-releasing factor in the goldfish. *Endocrinology*, **124**: 2509—2518.
- [17] Stojilkovic, S.S. *et al.*, 1988. Participation of voltage sensitive calcium channels in pituitary hormone release. *J. Biol. Chem.* **263**: 13054—13061.
- [18] —, 1989. Desensitization of pituitary gonadotropin secretion by agonist-induced inactivation of voltage-sensitive calcium channels. *J. Biol. Chem.*, **264**: 10939—10942.

EFFECTS OF EXTRACELLULAR CALCIUM AND POTASSIUM ON GROWTH HORMONE SECRETION FROM COMMON CARP PITUITARY IN VITRO

Lin Xinwei and Lin Haoran

(Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

ABSTRACT The effects of extracellular Ca^{2+} and K^+ on the basal and salmon GnRH (sGnRH)-stimulated growth hormone (GH) release from pituitary of common carp were studied using an in vitro perfusion system for pituitary fragments. The basal and sGnRH-stimulated GH secretion from perfused pituitary of common carp were extracellular Ca^{2+} -dependent. In the absence of extracellular Ca^{2+} , the significant reduction in the basal GH secretion and almost disappearance in the GH release responses to 2-min pulses of sGnRH (1, 10 and 100nM) were observed. Voltage-sensitive calcium channels (VSCC) antagonist verapamil (VER) significantly inhibited the basal GH release and GH release responses to 2-min pulses of sGnRH (1, 10 and 100nM) in a dose-dependent manner, indicating that the effects of extracellular Ca^{2+} on the basal and sGnRH-stimulated GH release are, at least partially, via the action of VSCC. 50mM K^+ significantly stimulated the basal GH release from perfused pituitary of common carp, and markedly potentiated the action of pulses of high dose of sGnRH (100nM) on GH secretion. The effects of elevated K^+ were extracellular Ca^{2+} -dependent.

KEYWORDS salmon GnRH, growth hormone, calcium, potassium, in vitro perfusion, common carp