

胡子鲶血浆中外源生长激素的代谢动力学

肖 东 陈松林^{*} 严安生^{**} 陈细华^{*} 邓文涛^{*}

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 沙市 434000)^{*}

(华中农业大学水产学院, 武汉 430070)^{**}

摘 要 采用草鱼生长激素夹心式酶联免疫吸附测定法(ELISA), 研究了重组鲤生长激素(rcGH)在胡子鲶血浆中的代谢动力学。肌肉注射 rcGH(0.2 和 1 μ g/g)后, 胡子鲶血浆 rcGH 水平迅速升高, 于 2 和 3h 时达峰值, 随后下降, 在注射后第 2 和 4 天, 血浆中检测不到 rcGH。腹腔注射 rcGH(0.2 和 1 μ g/g)后, 胡子鲶血浆 rcGH 水平也有同上类似的变动规律。胡子鲶腹腔注射 0.5、1 和 2 μ g/g 的 rcGH, 7 天后各组鱼血浆中的 rcGH 均被清除干净。向尾部血管内注射 rcGH(0.2 和 0.5 μ g/g)后, 胡子鲶血浆 rcGH 水平下降遵循指数性衰减规律, 24h 后血浆中 rcGH 均未清除干净。

关键词 胡子鲶, 重组鲤生长激素, 血浆代谢动力学

哺乳类或鱼类垂体来源的天然生长激素(growth hormone, GH)对鱼类均具有明显的促生长作用[Donaldson 等 1979, McLean 和 Donaldson 1993]。目前, 人类已利用基因工程技术合成了哺乳类和鱼类的重组生长激素(recombinant GH, rGH), 并证明 rGH 具有天然 GH 促进鱼类生长的活性[McLean 和 Donaldson 1993]。近年研究表明, 多肽和蛋白质能被鱼类消化道完整吸收而进入血液循环并保持活性[McLean 和 Donaldson 1990, Sir 和 Vemier 1992]。因而 rGH 的大量生产并作为鱼类生长促进剂已成为可能。

与 GH 促生长作用深入研究形成鲜明反差的是, 有关外源 GH 在鱼体不同组织中的代谢规律的研究很不深入, 目前仅国外有少量报道[McLean 和 Donaldson 1993], 且仅限于外源 GH 在银大马哈鱼[Down 等 1989, McLean 和 Donaldson 1993]、日本鳗鲡[Duan 和 Hirano 1991, McLean 和 Donaldson 1993]、虹鳟[McLean 1993]和真鲷[Ishiko 1992]等少数几种鱼血液中的代谢规律。由于对外源 GH 在鱼体血液中的代谢规律认识不深, 在确定外源 GH 施用剂量和频率时常凭经验行事, 因而十分有必要深入开展这项研究工作。

为此, 本研究以胡子鲶为研究对象, 研究重组鲤 GH(rcGH)在鱼体血浆中的代谢规律, 以期丰富我国鱼类生长内分泌学的研究内容, 并为指导实际生产提供理论依据和指导。

1 材料与方方法

1.1 实验鱼及其驯养

胡子鲶(*Clarias batrachus*)取自长江水产研究所窑湾实验场。实验前, 在室温和自然光周

期下暂养于室内玻璃水族箱(规格:95cm×45cm×50cm, 以下同)或水泥池(规格:95cm×90cm×90cm, 以下同)。实验用水为经充氧泵充分曝气后的自来水, 暂养及实验期间均保持微流水。实验鱼均投喂鲤鱼颗粒饲料(四川通威饲料厂生产, 直径为1.5~2mm)。

1.2 重组鲤生长激素

重组鲤生长激素(recombinant common carp GH, rcGH)由上海生物工程中心提供的重组鲤GH基因的大肠杆菌表达产物分离纯化而来。

1.3 实验设计

实验一, 胡子鲶规格为63~150g, 设2个处理组, 24尾/组, 分别从肌肉和腹腔注射rcGH, 剂量均为0.2 μg rcGH/g 体重(以下同)。实验二, 胡子鲶规格为100~280g, 设2个处理组, 24尾/组, 分别从肌肉和腹腔注射rcGH, 剂量均为1 μg/g。实验一、二在注射后0.5、1、2、3、6、9、12、24小时和2、4天或8、16天取样采血, 8尾/次组, 24尾鱼轮流采血。

实验三, 胡子鲶规格为20~50g, 设三个处理组。将经驯养的胡子鲶随机分成6组, 分养于6个玻璃水族箱中, 19尾/箱, 每两箱为一个处理组, 并继续驯养一段时间进行实验, 分别从腹腔注射0.5、1、2 μg/g 的rcGH。注射后1、3、5、7、9、12天采集血样, 5~6尾/次处理组。采过血的鱼剪鳍以作标记, 并放回原水族箱饲养, 不再参加采血。

实验四, 胡子鲶规格为116~170g, 用1mL注射器将含肝素钠的rcGH溶液从胡子鲶臀鳍基部处注入尾部血管内, 剂量为0.2和0.5 μg/g, 0.2和0.5 μg/g组实验鱼数分别为8尾和7尾。注射后5min采第一次血样, 然后在0.5、1、3、6、9、12、24小时采集血样, 每次所有实验鱼均采血。

1.4 血样采集、样品中GH含量的测定及数据分析

从尾部血管抽取血样。血样在4℃下静置数小时后, 10 000 r/min离心(4℃)10min, 收集血浆于-20℃冻存备测。样品中GH含量采用陈松林等[1996]建立的草鱼GH夹心式酶联免疫吸附测定法(ELISA)进行测定。实验数据用平均值±标准差($\bar{X} \pm S.D.$)表示。各平均数之间的差异用Student-t检验并进行分析。

2 结果

2.1 草鱼GH夹心式ELISA方法的特异性

图1显示, 经分离纯化的rcGH与草鱼(grass carp GH, gcGH)gcGH抗体发生交叉反应, 其序列稀释曲线与gcGH标准曲线平行, 可见样品中的rcGH能被该ELISA方法检测到。草鱼、建鲤、银鲫以及注射过rcGH的大口鲶、胡子鲶血浆在该测定系统中有剂量依存反应曲线; 而不含外源性rcGH的大口鲶、胡子鲶以及罗非鱼血浆在该测定系统中则没有免疫交叉反应, 表明该测定方法不能检测上述几种与草鱼亲缘关系相隔较远的鱼类血液中的内源性GH。图2也显示该ELISA方法不能检测出胡子鲶血液中的内源性GH。因而该测定方法能将胡子鲶、大口鲶血液中外源性的rcGH和内源性的GH相区分开。

2.2 胡子鲶血浆中 rcGH 的代谢规律

图 3、4 显示了肌肉或腹腔注射 rcGH 后, 胡子鲶血浆中外源 rcGH 吸收和清除情况。肌肉注射 rcGH(0.2 μ g/g)后, 血浆 rcGH 水平迅速升高, 2h 时达峰值(65.9 \pm 16.9)ng/mL, 3h 时已降至(19.6 \pm 7.6)ng/mL, 随后缓慢下降; 12 和 24h 时分别降至(9.8 \pm 3.8)ng/mL 和(5.9 \pm 2.9)ng/mL, 48h 时血浆中检测不到 rcGH(图 3)。腹腔注射 rcGH(0.2 μ g/g)后, 血浆 rcGH 水平也迅速升高, 2h 时达峰值(75.4 \pm 49.1)ng/mL, 随后缓慢下降, 3h 时仍保持在(60.3 \pm 35.1)ng/mL 水平, 12h 时已降至(9.1 \pm 4.1)ng/mL, 24h 时血浆中检测不到 rcGH(图 3)。肌肉和腹腔注射组(0.2 μ g/g)在各相对应采样点处的鱼体平均体重无显著性差异($P > 0.05$), 腹腔注射组在 3 和 6h 时血浆 rcGH 水平显著高于肌肉组($P < 0.05$), 1 天后又极显著低于后者($P < 0.001$), 其余时间两注射组血浆 rcGH 水平均无显著性差异($P > 0.05$)。

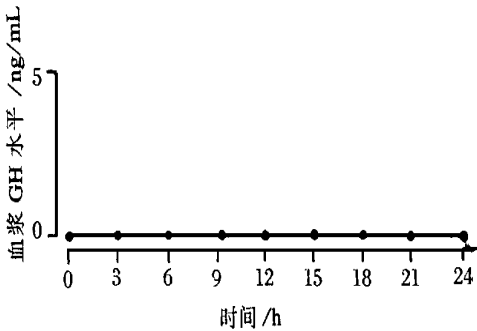


图 2 胡子鲶血浆 GH 水平的日周期变化

Fig. 2 Daily variation of plasma GH levels from *C. batrachus* (水温 20~23 $^{\circ}$ C)

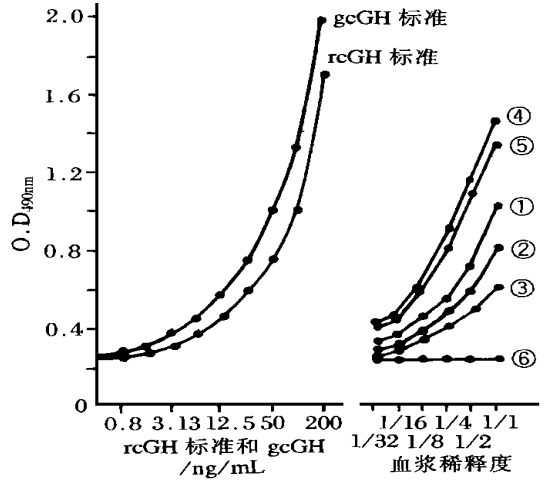


图 1 几种鱼类血浆在草鱼 GH ELISA 系统中的稀释曲线

Fig. 1 Dilution curves for several teleostean plasma in the gcGH ELISA

- 注: ①草鱼血浆; ②建鲤血浆; ③银鲫血浆;
- ④注射 rcGH 的大口鲮血浆;
- ⑤注射 rcGH 的胡子鲶血浆;
- ⑥大口鲮、胡子鲶和罗非鱼血浆

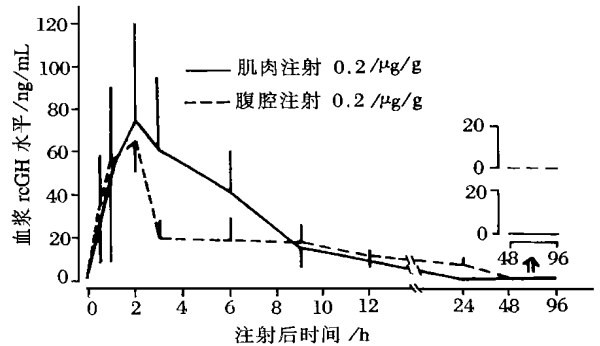


图 3 胡子鲶肌肉和腹腔注射 rcGH 后, 血浆中外源 rcGH 吸收和清除曲线

Fig. 3 Plasma uptake and clearance curves of exogenous rcGH after an intraperitoneal (i.p.) and intramuscular (i.m.) injection of rcGH into *C. batrachus* (水温 20~24.5 $^{\circ}$ C)

肌肉和腹腔注射 rcGH(1 μ g/g)后, 血浆 rcGH 水平迅速升高, 3h 时达峰值, 分别为(1040.74 \pm 380.84)ng/mL 和(1186.11 \pm 48.23)ng/mL, 两峰值间和此时鱼体平均体重间均无显著差异($P > 0.1$), 12h 时已降至(357.85 \pm 247.10)ng/mL 和(280.58 \pm 30.12)ng/mL, 2 天降至(19.27 \pm 14.83)ng/mL 和(23.87 \pm 23.28)ng/mL, 4 天后血浆中均检测不到 rcGH(图 4)。

胡子鲶腹腔注射 0.5、1 和 2 $\mu\text{g/g}$ 的 rcGH 1 天后, 血浆 rcGH 水平依次为(4.69 \pm 2.16)ng/mL、(8.75 \pm 4.09)ng/mL 和(15.37 \pm 4.62)ng/mL、3 天时依次降为(2.75 \pm 0.44)ng/mL、(4.53 \pm 1.35)ng/mL 和(5.39 \pm 0.29)ng/mL, 5 天时依次为 0ng/mL、(3.21 \pm 2.11)ng/mL 和(3.55 \pm 1.69)ng/mL, 7 天时各组鱼血浆中均检测不到 rcGH, 即各组胡子鲶血液中 rcGH 基本清除干净(图 5)。

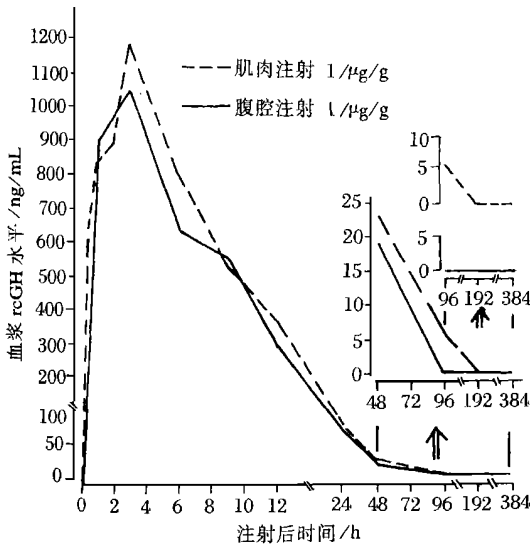


图 4 胡子鲶肌肉和腹腔注射 rcGH 后, 血浆中外源 rcGH 吸收和清除曲线

Fig. 4 Plasma uptake and clearance curves of exogenous rcGH after intraperitoneal and intramuscular injection of rcGH into *C. batrachus* (水温 26~30 $^{\circ}\text{C}$)

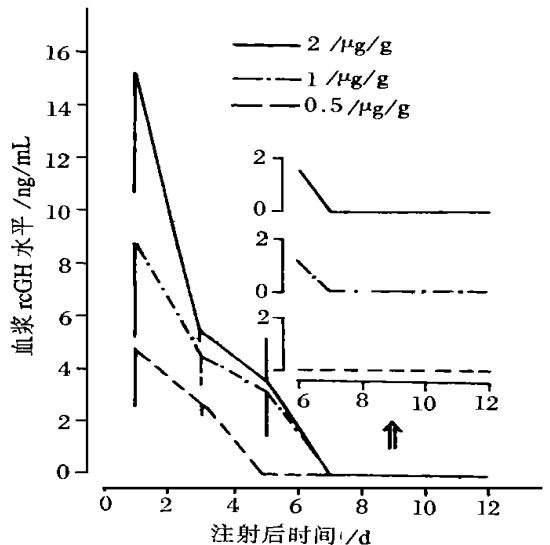


图 5 胡子鲶腹腔注射 rcGH 后, 血浆中外源 rcGH 吸收和清除曲线

Fig. 5 Plasma uptake and clearance curves of exogenous rcGH after intraperitoneal injection of rcGH into *C. batrachus* (水温 26~30 $^{\circ}\text{C}$)

图 6 显示了胡子鲶尾部血管内注射 rcGH (0.2 和 0.5 $\mu\text{g/g}$) 后, 血浆中 rcGH 清除规律。注射 rcGH (0.2 $\mu\text{g/g}$) 后, 血浆 rcGH 水平下降遵循指数性衰减 (exponential decay) 规律。0.2 $\mu\text{g/g}$ 组在注射后 1h 内, 清除率很高, 血浆 rcGH 水平迅速从“0”时的 (1089.84 \pm 467.95)ng/mL 降至 1h 时的 (276.07 \pm 102.62)ng/mL; 1~6h 内清除率较高, 6h 时降至 (47.31 \pm 19.86)ng/mL, 之后清除率很低, 24h 时血浆 GH 水平为 (7.72 \pm 2.15)ng/mL (图 6-A)。0.5 $\mu\text{g/g}$ 组也有同上类似的清除规律。注射后 1h 内, rcGH 迅速从血浆中清除, 之后清除速度逐渐减慢 (图 6-B)。

3 讨论

3.1 鱼体血液中外源 GH 的代谢规律

血浆外源 GH 代谢动力学是研究外源 GH 在鱼体血液吸收、分布、代谢和清除的规律。Down 等 [1988] 给银大马哈鱼肌肉或腹腔注射 rcGH (0.5 和 5 $\mu\text{g/g}$) 后 6h 即出现 rcGH 峰值, 6~24h 血浆 rcGH 含量迅速下降, 24h 后缓慢下降, 直至 32 天后仍未清除完。给日本鳗鲡肌肉或腹腔注射重组鳗 GH (reGH) (30ng/g) 后, 1h 时出现 reGH 峰值, 3h 时血浆 reGH 水平降至峰值的一半不到, 随后血浆 reGH 水平缓慢下降, 12h 时血浆中未检测到外源性的 reGH [Duan 和

Hirano 1991]。给真鲷肌肉或腹腔注射重组鲑 GH ($1\mu\text{g/g}$) [Ishioko 1992] 以及我们在胡子鲶上的研究(图 3、4)都出现了类似以上的变化规律。这种注射外源 GH 后, 血浆外源 GH 水平在较短时间内急剧升高, 并达峰值, 随后快速或缓慢下降, 直至完全从血液中清除的变化规律符合一级吸收、一级消除的药物浓度动力学规律[竺心影 1992]。纵观前人研究资料和本次实验结果, 不难发现, 峰值出现时间、峰值大小和清除速率等代谢动力学指标因受多种因素影响, 因而在不同时间、不同鱼类上所做实验测得的动力学指标就表现出差异。这些因素如鱼的种间和种内差异、鱼的大小、GH 来源、剂量、给药途径、检测方法、实验水温 以及种特异性的外源 GH 清除率等。

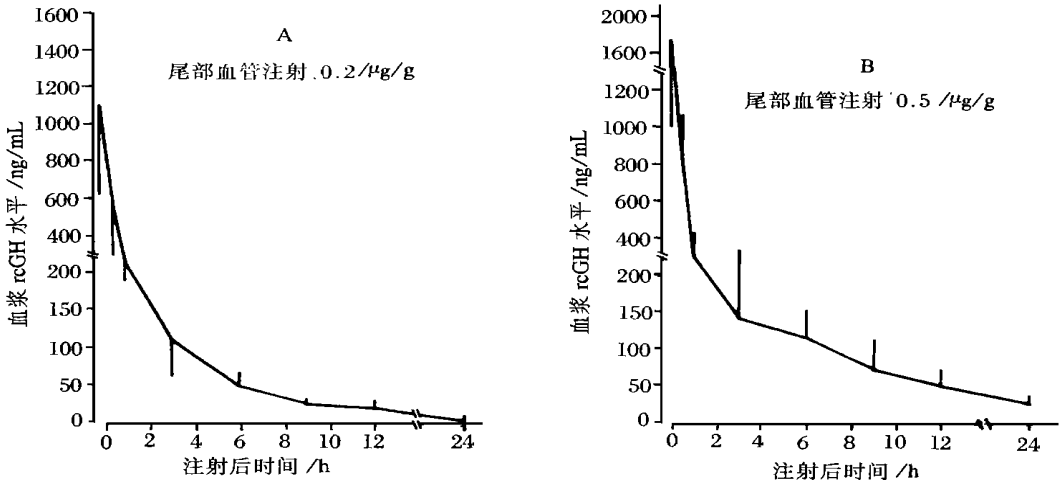


图 6 胡子鲶尾部血管内注射 rcGH 后, 血浆外源 rcGH 清除曲线

Fig. 6 Plasma clearance curves of exogenous rcGH after injections of intra-caudal vessel of rcGH into *C. batrachus*

A: 注射 rcGH $0.2\mu\text{g/g}$, 水温 $18\sim 23^{\circ}\text{C}$; B: 注射 rcGH $0.5\mu\text{g/g}$, 水温 $18\sim 24^{\circ}\text{C}$

将外源 GH 直接注入鱼体血液中, 更有助于认识外源 GH 从血液中清除的规律。以背主动脉插管法将牛 GH ($10\mu\text{g/g}$) 直接注入虹鳟血液中, 采血检测发现, 外源牛 GH 在 4h 内从血浆中清除完 [McLean 和 Donaldson 1993]。用同样方法给鳗鲡动脉注射鳗 GH [McLean 和 Donaldson 1993] 以及我们在胡子鲶上的研究(图 6)都出现类似以上的变化规律。由此可见, 外源 GH 注入血液后, 血浆外源 GH 浓度的改变遵循指数性衰减规律。

3.2 外源 GH 合理的施用剂量

外源 GH 在血液中的代谢规律为合理施用 GH 提供了理论依据。合理的剂量和频率必须保证在比较长的时间内, 血液中外源 GH 能维持一个合理有效水平, 即血液中 GH 达到能最大限度发挥鱼体生长潜能所需的体内 GH 水平, 同时要防止外源 GH 在鱼体各组织(尤其是可食部分)积累或因外源 GH 浓度过高引起负反馈作用。

Donaldson 和 Fagerlund [1979] 认为施用 GH 导致受体鱼生长速度加快原因可能是由于鱼类在正常情况下鱼体内 GH 的量并没有达到饱和值, 而外来的 GH 仍有发挥其生理作用的余地。外源 GH 施用浓度过低, 将不能充分发挥鱼体生长潜能; 但是, 鱼体内 GH 浓度并非越高越好, 它也有一个适宜的浓度值, 并且是不断变化的。根据鱼体血液中 GH 浓度一般变化在 $10\sim$

100ng/mL 的研究结果[陈松林等 1996],并结合外源 GH 在鱼体血液中的代谢规律,不难发现,外源 GH 施用剂量过高时,有很大部分外源 GH 很可能未与 GH 受体结合就被血液中的多种酶类降解而失活,未能发挥其生理作用,造成 GH 浪费,同时有可能引起负反馈作用,这是因为鱼类和哺乳类一样,GH 在组织和细胞水平起作用的第一步是和细胞膜上特异性受体结合,而在组织和细胞水平,GH 受体的数量和亲和力的变化明显影响这些组织和细胞对血液中 GH 的敏感性;营养状况、代谢水平、应激反应以及其它一些激素(如甲状腺素)都可能使 GH 受体数量和亲和力发生变化,从而影响 GH 促生长作用[Peter 和 Marchant 1995]。此外,GH 受体的总容量也是有限的。

研究表明:通过 GH 分子中部分氨基酸的去除、取代或增加一定数目氨基酸将能有效提高 GH 对受体的亲和力,以及抗酶解的能力,从而延长其半衰期和降低其从血液中清除的速率[McLean 和 Donaldson 1993]。Down 等[1989] 研究表明基因工程合成的一种牛 GH 的类似物(分子量为 21 千道尔顿,比天然牛 GH 分子少 7 个氨基酸残基)对幼龄银大马哈鱼的促生长活性约为天然的三倍。日本、加拿大等国科学家已成功解决了重组 GH 经口投喂的难关。经口投喂 GH 不仅省时省力,同时也不因操作而影响鱼类正常生长发育,这为降低外源 GH 施药剂量和提高施药频率创造了条件,从而有利于节约 GH。另外,鱼类血液中内源性 GH 水平具有明显的日周期和季节性周期变化[Peter 和 Marchant 1995],而目前这方面研究还不够深入。因而仅凭一些动力学实验很难确定在不同季节,在鱼类不同的生长发育阶段为挖掘其最大生长潜能所需的外源 GH 的最小有效剂量。对金鱼和草鱼研究表明血液中 GH 水平和鱼类生长速率的季节性变化虽有明显的相关性,但并不完全吻合[Peter 和 Marchant 1995],这又增大了难度。今后应采取动力学实验和促生长实验相结合的办法,并结合细胞和分子水平上的研究,来确定合理的符合上述标准的外源 GH 的施用剂量和频率,以期发挥其最大促生长作用。

参 考 文 献

- 陈松林, 陈细华, 邓文涛等. 1996. 草鱼生长激素夹心式酶联免疫吸附测定法建立及鉴定的研究(英文). 动物学报, 42(4): 386~393
- 竺心影(主编). 1992. 药理学(第三版). 北京:人民卫生出版社. 100~150
- Donaldson E M, Fagerlund UH M. 1979. Hormonal enhancement of growth in fish. In: W S Hoar, D J Randall, Brett J R, eds. Fish Physiology, Vol. 8, Bionenergetics and Growth. Academic Press, New York, 455~597
- Down NE, Dye H M, Donaldson E M et al. 1988. Plasma kinetics of injected recombinant chicken somatotropin in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) using a homologous radioimmunoassay. Fish Physiol Biochem, 5: 49~57
- Down N E, Donaldson E M, Dye H M et al. 1989. A potent analog of recombinant bovine somatotropin accelerates growth in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Can J Fish Aquat Sci, 47: 178~183
- Duan C, Hirano T. 1991. Plasma kinetics of growth hormone in Japanese eel (*Anguilla japonica*). Aqua, 95: 179~188
- Ishiko H. 1992. Effect of recombinant red sea bream growth hormone on growth of young red sea bream. Nipp Suis Gakkaish, 58(12): 2335~2340
- McLean E, Donaldson E M. 1990. The absorption of bioactive proteins by the fish gastrointestinal tract: A review. J Aquat Anim Health, 2: 1~11
- McLean E, Donaldson E M. 1993. The role of growth hormone in growth of poikilotherms. In: Schriebman M P, Scanes C G, Pang P K T, eds. The Endocrinology of Growth, Development and Metabolism in Vertebrates. Academic Press, San Diego. 43~71
- Peter R E, Marchant T A. 1995. The endocrinology of growth in carp and related species. Aqua, 129: 299~321
- Sir M F, Vemier J M. 1992. Intestinal absorption of protein in teleost fish. Comp Biochem Physiol, 103A: 771~781

PLASMA KINETICS OF RECOMBINANT COMMON CARP GROWTH HORMONE IN *CLARIAS BATRACHUS*

XIAO Dong, CHEN Song-Lin^{*}, YAN An-Sheng^{**}, CHEN Xi-Hua^{*}, DENG Wen-Tao^{*}

(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

(Yangtze River Fisheries Research Institute, CAFS, Shashi 434000)^{*}

(Fisheries College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)^{**}

ABSTRACT Using the sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for grass carp growth hormone, plasma kinetics of rcGH in *Clarias batrachus* after administrations of rcGH were investigated. After intramuscular injections of rcGH (0.2 and 1 $\mu\text{g/g}$) into *C. batrachus*, the plasma rcGH levels were increased, peak values were seen at the end of 2 and 3 hours post-injection, and rcGH in plasma was undetected on the 2nd and 4th days post-injection, respectively. Similar uptake and clearance patterns were seen after intraperitoneal injections rcGH (0.2 and 1 $\mu\text{g/g}$) into *C. batrachus*. Intraperitoneal injections of rcGH (0.5, 1 and 2 $\mu\text{g/g}$) to walking catfish, rcGH in plasma was all undetected on the 7th day post-injection. When rcGH (0.2 and 0.5 $\mu\text{g/g}$) was injected into intra-caudal vessel of *C. batrachus*, plasma rcGH levels decreased by way of exponential decay, rcGH in plasma was detectable 24h postintra-caudal vessel injection.

KEYWORDS *Clarias batrachus*, Recombinant common carp growth hormone (rcGH), Plasma metabolic kinetics