

文章编号:1000-0615(2001)03-0203-06

## 黑鲷生长激素及其受体的季节变化

邓 利<sup>1</sup>, 张为民<sup>1</sup>, 林浩然<sup>1</sup>, 郑汉其<sup>2</sup>

(1. 中山大学水生经济动物研究所, 广东 广州 510275; 2. 香港中文大学生物化学系, 香港 沙田)

**摘要:**采用黑鲷生长激素(seabream growth hormone, brGH)放射免疫测定法(brGH RIA)及黑鲷生长激素放射受体测定法(brGH RRA),研究了不同季节(3月、6月、9月及12月)黑鲷血清GH水平及肝脏和性腺中生长激素受体(growth hormone receptor, GHR)水平的变化,同时测定了黑鲷白肌及肝脏RNA-DNA比率及黑鲷肥满度(condition factor, K)和性腺指数(gonadosomatic index, GSI)的季节变化。黑鲷血清GH水平于6月出现高峰,显著高于3月、9月至12月的水平( $P < 0.01$ )。黑鲷肝脏中GHR水平在9月及12月显著高于3月及6月的水平( $P < 0.01$ );黑鲷性腺中的GHR水平在9月显著高于其他月份( $P < 0.05$ )。雄性黑鲷肝脏中RNA-DNA比率在四个季节均无显著差异,雌性个体肝脏中RNA-DNA比率在6月显著低于3月( $P < 0.01$ );雄性及雌性黑鲷白肌中RNA-DNA比率在6月均显著高于其他季节的水平( $P < 0.05$ )。黑鲷的性腺指数(GSI)在12月达到最高,3月以后显著下降。结果表明,黑鲷血清GH水平、GHR水平和白肌及肝脏中RNA-DNA比率均存在明显的季节变化。本文还探讨了血清GH水平、肝脏及性腺中GHR水平与鱼体生长和繁殖之间的关系。

**关键词:**黑鲷;生长激素;生长激素受体;季节变化

**中图分类号:**Q45;S917 **文献标识码:**A

## Seasonal variations of serum growth hormone levels and growth hormone receptors in *Sparus macrocephalus*

DENG Li<sup>1</sup>, ZHANG Wei-min<sup>1</sup>, LIN Hao-ran<sup>1</sup>, Christopher H K Cheng<sup>2</sup>

(1. Institute of Aquatic Economic Animal, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;

2. The Chinese University of Hong Kong, Shatin, N T, Hong Kong, China)

**Abstract:** The levels of serum growth hormone (GH) and growth hormone receptor (GHR) in liver and gonad of black seabream, *Sparus macrocephalus* in different seasons (March, June, September and December) were measured by bream GH radioimmunoassay (brGH RIA) and bream GH radioreceptor assay (brGH RRA) respectively. The seasonal variations of RNA-DNA ratio in liver and white muscle, condition factor (K factor) and gonadosomatic index (GSI) in black seabream were also determined. Serum GH level of black seabream is the highest in June ( $P < 0.01$ ). The level of GHR in liver of black seabream is higher in September and December than that in March and in June ( $P < 0.01$ ). The level of GHR in gonad of black seabream is the highest in September ( $P < 0.01$ ). The RNA-DNA ratio in liver of female black seabream is lower in June than that in March ( $P < 0.01$ ). The RNA-DNA ratio in white muscle of black seabream is the highest in June ( $P < 0.01$ ). GSI is the highest in December and decreases significantly after March. Results indicate that apparent seasonal variations exist in the levels of serum GH, GHR in liver and in gonad and the ratios of RNA-DNA in white muscle and in liver. The relationships between the levels of serum GH, GHR in liver and in gonad and

收稿日期:2000-10-23

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970586号)

第一作者:邓利(1971-),男,贵州桐梓人,博士生,主要从事生鱼类生理学研究。Tel: 020-84110188, E-mail: lideng03@sina.com

growth and reproduction of black seabream are discussed.

**Key words:** *Sparus macrocephalus*; growth hormone; growth hormone receptor; seasonal variation

生长激素在鱼类生长过程中起着重要的调节作用。已有的研究显示,鱼类的生长速率存在着季节性变化,而鱼体血液中的 GH 水平也存在季节性差异, GH 水平与鱼体生长的季节性变化存在明显的相关联系但并不完全吻合<sup>[1,2]</sup>。这可能一方面是因为鱼类生长除了受到 GH 调节外,水温、营养状况等生态因子在不同的季节对鱼类生长也有不同程度的影响;在另一方面, GH 生理效应的发挥还受到 GH 靶组织上 GHR(数量及亲和力)的影响,尚不知鱼体组织中 GHR 水平是否普遍地存在季节性变化,以及这种变化与鱼的生长速度、GH 水平的季节性变化有何关系。另外,人们已普遍地在鱼类性腺中检测出特异性结合位点,并发现 GH 参与调节鱼类性腺的发育及性腺的最后成熟<sup>[3-5]</sup>。在性腺发育的不同阶段血清 GH 水平存在差异<sup>[6]</sup>, Gomez 等<sup>[7,8]</sup>在处于不同发育阶段的虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)性腺中检测到的 GHR 水平存在着差异,但有关 GH 对鱼类性腺发育的调节在其受体水平的研究资料还较为缺乏。本文以黑鲷为材料,采用我们已经建立的黑鲷生长激素放射免疫测定法(brGH RIA)及黑鲷生长激素放射受体测定法(brGH RRA),研究不同季节黑鲷血清 GH 水平及肝脏和性腺中生长激素受体水平的变化情况,试图从生长激素受体水平考察有关鱼类生长、生殖内分泌的一些调节机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

黑鲷采自广东省大亚湾水产试验中心的海水养殖基地,在4个季节(3月、6月、9月及12月)分别跟踪采集1.5龄及3龄的鱼,分别是同批鱼苗在同样条件下养成的,其体长范围分别为 $(18.9 \pm 0.3)$ cm 及 $(26.9 \pm 0.6)$ cm,体重范围分别为 $(200.5 \pm 11.3)$ g 及 $(588.8 \pm 41.1)$ g。1.5龄组的黑鲷处于功能性雄性阶段,3龄组的黑鲷是已经通过性转化的雌性个体。鱼从海上网箱内捕回后放入试验中心海水暂养池,暂养1d后取样,取样时用湿毛巾包裹鱼体,对每尾鱼测量体重、体长及抽血后取其肝脏、性腺等组织。取样过程均在冰上操作,所取样品放入液氮中带回实验室保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 待测。

### 1.2 药品

重组鲷鱼生长激素(brGH)及兔抗鲷鱼生长激素血清购自 Gropep 公司(Australia),羊抗兔血清由香港大学 Anderson 博士惠赠,1,3,4,6-四氯-3a,6a-二苯乙内酰脲(Iodogen)购自 Amersham 公司(U.K.),苯甲基磺酰氟(PMSF)、亮抑酶肽(Leupeptin)、抑胃酶肽(A)(PepstatinA)及牛血清蛋白(BSA)购自 Sigma 公司(USA),葡聚糖凝胶 G-75(Sephadex G-75)购自 Pharmacia 公司(Sweden), $\text{Na}^{125}\text{I}$ 购自中国原子能研究院。核酸提取试剂盒 Trizol 为 Gibicol 公司产品。

### 1.3 总 RNA 及总 DNA 的提取

样品中总 RNA 及总 DNA 采用 Trizol 试剂提取,用紫外分光光度计(Pharmacia LKB)测定总 RNA 及总 DNA 的浓度。

### 1.4 生长激素的标记

参照文献[9]的方法并略作改动。主要步骤为:(1) $5\mu\text{g}(5\mu\text{L})$  brGH 与  $1\text{ mCi Na}^{125}\text{I}$  在 Iodogen 包被管中混合,加  $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Hepes 缓冲液(pH 7.2)至反应总体积为  $30\mu\text{L}$ ,室温下反应 15 min,反应过程中偶尔振荡反应液;(2)用  $0.3\text{ mL } 50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Hepes 缓冲液(pH 7.2)终止反应,摇匀反应液,分别取  $2\mu\text{L}$  反应液于 3 支  $\gamma$ -计数管用于测定标记 GH 的放射比活性(specific radioactivity);(3)将反应液吸上 Sephadex G-75( $1\text{ cm}\times 50\text{ cm}$ )柱,用  $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Hepes 缓冲液(pH 7.2,含 0.2% BSA)进行洗脱,洗脱液

收集为每管 1mL,测每管放射强度,取位于蛋白峰的 4~6 管用于黑鲷 GH 的放射免疫测定及放射受体测定。用三氯乙酸(TCA)沉淀法测标记 GH 的放射比活性<sup>[10]</sup>。结果为  $158\mu\text{Ci}\cdot\mu\text{g}^{-1}\text{GH}$ ,表明标记效果较好。

### 1.5 GH 水平测定

黑鲷 GH 双抗体放射免疫测定法,参照文献[11]的方法。

### 1.6 GHR 水平测定

GH 放射受体测定法参照文献①方法。

鱼体肥满度(%) =  $100 \times \text{体重}(\text{g}) / \text{体长}^3(\text{cm}^3)$ ;性腺指数(%) =  $\text{性腺重}(\text{g}) / \text{体重}(\text{g}) \times 100$ 。

用 SPSS 统计软件包进行方差分析及相关分析。

## 2 结果

### 2.1 黑鲷血清 GH 水平的季节变化

黑鲷血清 GH 水平于 6 月出现高峰,显著高于其他季节的水平( $P < 0.01$ )(图 1)。

### 2.2 黑鲷肝脏及性腺中 GHR 水平的季节变化

黑鲷肝脏中 GHR 水平(brGH 特异性结合率)在 9 月、12 月显著高于其 3 月及 6 月( $P < 0.01$ )(图 2);黑鲷性腺中的 GHR 含量在 9 月显著高于其他月份( $P < 0.01$ )(图 3)。

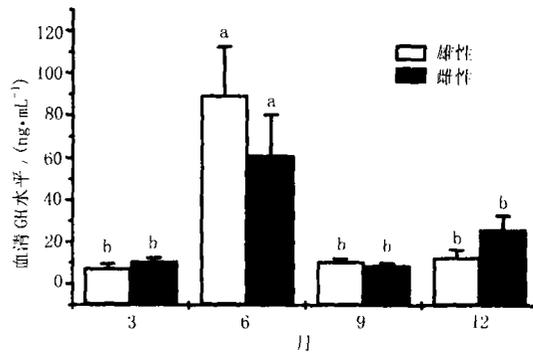


图 1 黑鲷血清 GH 水平的季节性变化

Fig.1 Seasonal variations of serum growth hormone level in *S. macrocephalus*

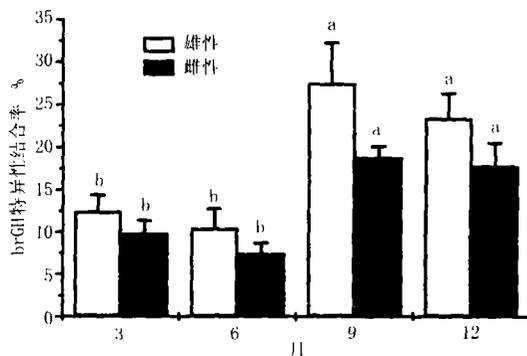


图 2 黑鲷肝脏中 GHR 水平的季节性变化

Fig.2 Seasonal variations of the level of growth hormone receptor in liver of *S. macrocephalus*

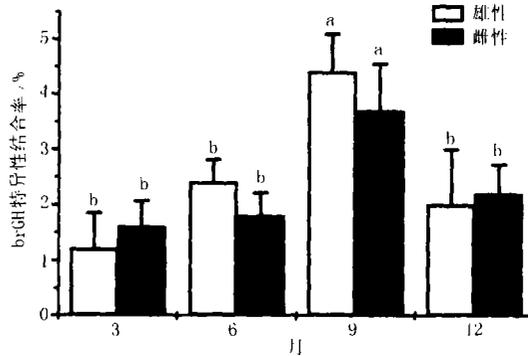


图 3 黑鲷性腺中 GHR 水平的季节性变化

Fig.3 Seasonal variations of the level of growth hormone receptor in gonad of *S. macrocephalus*

### 2.3 黑鲷性腺指数(GSI)及肥满度(K)的季节变化

黑鲷雄性及雌性个体的 GSI 均在 12 月显著升高( $P < 0.01$ ),雄性个体的 GSI 在 3 月仍维持较高水平,而雌性个体的则已显著下降(图 4)。黑鲷雄性个体的肥满度(K)在 6 月显著低于 3 月( $P < 0.05$ ),雌性个体的则在 6 月显著低于 12 月( $P < 0.05$ )(图 5)。

①邓利,张为民,林浩然.黑鲷生长激素放射受体测定法的建立及受体组织分布的研究.2000.

## 2.4 黑鲷肝脏及白肌中 RNA-DNA 比率的季节变化

雄性黑鲷肝脏中 RNA-DNA 比率在四个季节均无显著差异,雌性个体肝脏中 RNA-DNA 比率在 6 月显著低于 3 月( $P < 0.01$ ) (图 6);雄性及雌性黑鲷白肌中 RNA-DNA 比率在 6 月均显著高于其他季节的水平( $P < 0.05$ ) (图 7)。

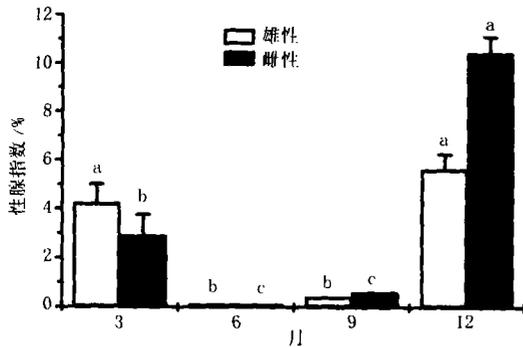


图 4 黑鲷性腺指数(GSI)的季节变化

Fig.4 Seasonal variations of gonadosomatic index in *S. macrocephalus*

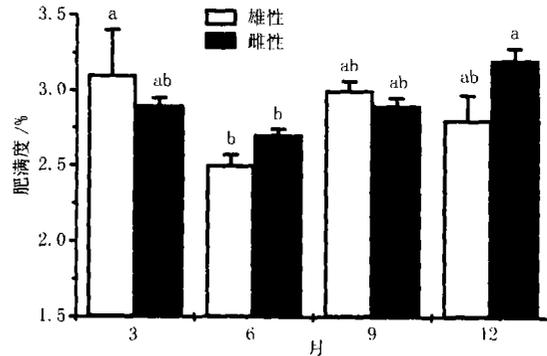


图 5 黑鲷肥满度(K)性腺指数(GSI)的季节变化

Fig.5 Seasonal variations of condition factor in *S. macrocephalus*

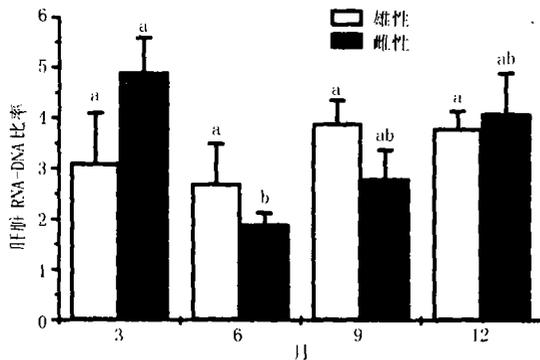


图 6 黑鲷肝脏中 RNA-DNA 比率的季节变化

Fig.6 Seasonal variations of the RNA-DNA ratio in liver of *S. macrocephalus*

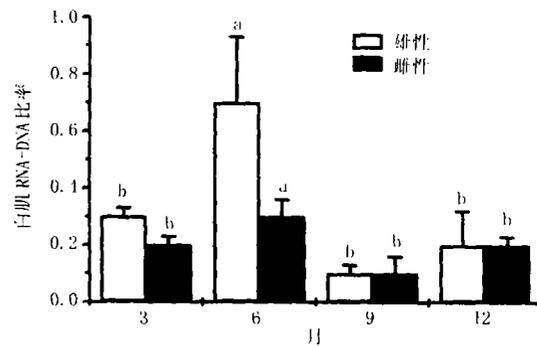


图 7 黑鲷白肌 RNA-DNA 比率的季节变化

Fig.7 Seasonal variations of the RNA-DNA ratio in white muscle of *S. macrocephalus*

## 2.5 相关分析

对上述测定指标季节变化的相关分析结果见表 1。在雄性个体中,血清 GH 水平与白肌 RNA-DNA 比率呈显著正相关( $P < 0.01$ ),与 GSI 呈显著负相关( $P < 0.05$ );肝脏 GHR 与白肌 RNA-DNA 比率呈显著负相关( $P < 0.05$ )。雌性个体血清 GH 水平与白肌 RNA-DNA 比率呈显著正相关( $P < 0.05$ );性腺 GHR 水平与肝脏 RNA-DNA 比率呈显著正相关( $P < 0.05$ );肝脏 GHR 水平与 K 及 GSI 呈显著正相关( $P < 0.05$ );K 与 GSI 呈显著正相关( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

### 3.1 GH、GHR 水平及与生长的关系

鱼类血清中 GH 水平存在着季节性变化<sup>[12-14]</sup>。类似地,本研究表明黑鲷血清 GH 水平亦存在明显的季节性变化,高峰值出现在 6 月。

表 1 黑鲷不同季节的血清 GH、肝脏及性腺中 GHR、肝脏及白肌中 RNA-DNA 比率、肥满度(K)和性腺指数(GSI)间的相关系数(n=36)

Tab.1 Correlation coefficients of the serum GH level, GHR level in liver and gonad, ratio of RNA-DNA in liver and white muscle, condition factor(K) and gonadosomatic index(GSI) at different seasons in *S. macrocephalus* (n=36)

		血清 GH	性腺 GHR	肝脏 GHR	肝脏 RNA/DNA	白肌 RNA/DNA	肥满度	性腺指数
血清 GH	雄性	-	-0.167	-0.282	-0.143	0.829**	-0.437	-0.485*
	雌性	-	-0.012	-0.361	-0.300	0.593*	-0.258	-0.227
性腺 GHR	雄性		-	0.378	0.138	-0.531	0.289	-0.303
	雌性		-	0.052	0.647*	-0.390	-0.110	-0.167
肝脏 GHR	雄性			-	0.353	-0.605*	0.164	0.097
	雌性			-	0.164	0.168	0.593*	0.559*
肝脏 RNA/DNA	雄性				-	-0.452	-0.297	0.316
	雌性				-	-0.241	0.390	0.336
白肌 RNA/DNA	雄性					-	-0.464	-0.164
	雌性					-	0.388	0.421
肥满度	雄性						-	0.129
	雌性						-	0.726**
性腺指数	雄性							-
	雌性							-

注: \* 和 \*\* 的数值分别示双尾检验达显著( $P < 0.05$ )和极显著水平( $P < 0.01$ )。

鱼体组织(如白肌、肝脏等)中 RNA-DNA 比率反映了该组织内的合成代谢状态而被人们用来作为鱼类生长一个指标<sup>[15]</sup>。其中以白肌中 RNA-DNA 比率更能反映鱼体身体生长状况,因为肝脏中 RNA-DNA 比率可能受到鱼体的代谢状况、性腺发育程度等影响而不能较真实地反映鱼的身体生长<sup>[15]</sup>。本研究中雄性个体白肌 RNA-DNA 比率与血清 GH 水平呈显著正相关,在 GH 水平处于最高的 6 月白肌中 RNA-DNA 比率也最高。

已有的报道显示,鱼类生长速率的峰值往往滞后于血清中 GH 峰值,滞后时间有 1 周<sup>[13]</sup>甚至 1 个月<sup>[12,14]</sup>,人们尚不知该现象产生的原因。从 RNA 的高丰度表达达到蛋白质的大量合成最后到鱼体身体组成的积累(在宏观上表现为能测定出的生长)需要一定的时间,于是白肌 RNA-DNA 比率实际上反映了鱼体生长的潜能,继白肌 RNA-DNA 比率峰值之后可能会有一个身体生长速率的高峰。因此,本研究中血清 GH 水平的峰值与白肌中 RNA-DNA 比率的峰值同步表明继血清 GH 峰之后可能会出现一个鱼体生长的高峰。该推论可能反映了人们发现的鱼类生长速率峰值往往滞后于血清 GH 峰值这一现象产生的一种机制。

肝脏是鱼类 GH 的主要靶组织,黑鲷肝脏中 GHR 水平也呈明显的季节变化。在 6 月 GH 水平及以白肌中 RNA-DNA 比率为指标的身体生长率最高时肝脏中 GHR 水平却最低。GH 是调节 GHR 水平的因子之一,GH 对其受体既有下调节(down-regulation)又有上调节(up-regulation)作用。通过体外注射试验表明动物在注射 GH 后 GHR 会出现急性的下降<sup>[16]</sup>,而慢性多次注射 GH 则可提高 GHR 水平<sup>[17]</sup>。尚不清楚鱼类内源性的 GH 对其靶器官内受体的调节机理,黑鲷肝脏中 GHR 在 6 月的低水平是否是此时血清中高水平 GH 对其下调节的结果有待进一步研究。

### 3.2 GH、GHR 水平及与繁殖的关系

脊椎动物的生长与生殖活动有着密切的联系并相互作用,虽然垂体分泌的促性腺激素是调节性腺功能的主要激素,但已有较多的研究表明 GH 在性腺发育过程中起调节作用<sup>[4]</sup>。已证明 GH 不仅能增强 GH 刺激雌二醇生成的作用<sup>[3]</sup>,还能直接刺激卵巢滤泡细胞产生类固醇激素<sup>[5]</sup>。鱼类 GH 水平在性腺成熟和排卵时明显升高<sup>[6,14,18]</sup>。同时人们已在多种鱼的性腺中检测到 GH 的特异性结合位点<sup>[3-5,7,8]</sup>。

关于鱼类性腺发育过程中其性腺内 GHR 变化的报道尚不多见。Gomez 等<sup>[7,8]</sup>研究了虹鳟性腺发育成熟过程中精巢及卵巢内 GHR 水平,结果单位性腺重所含 GHR 量随性腺发育至成熟呈下降趋势,而整

个性腺所含的受体量则逐渐上升,在排卵前达到最高。就我们采集的材料看,在3月黑鲟的繁殖活动接近尾声,性腺开始进入退化期,9月性腺进入生长期,12月其性腺已处于成熟期。本研究结果表明黑鲟性腺中GHR水平(单位性腺重)在3月最低,6月开始上升,到9月达到最高。可见,黑鲟性腺中GHR水平在其性腺处于退化期时最低,随后经过恢复期,并随着性腺的进一步发育而逐渐上升至成熟期之前达到最高。

在雌性个体肝脏中GHR水平与GSI则显著正相关,由于卵黄蛋白原是在肝脏中合成,因此雌性个体肝脏GHR水平与GSI的正相关关系可能反映出肝脏中GHR参与调节卵黄蛋白原的合成。人们普遍认为GH在性腺发育过程中起调节作用,但我们的结果显示,黑鲟血清中GH水平在雌性个体中与GSI无显著相关性,在雄性个体中甚至与GSI呈显著负相关,血清GH水平与性腺发育无明显的相关性。因此,黑鲟血清GH水平与性腺发育的关系可能主要由肝脏及性腺中GHR来调节。

#### 参考文献:

- [1] Marchant T A, Peter R E. Seasonal variations in body growth rates and circulating growth hormone in the goldfish, *Carassius auratus* [J]. *J Exp Zool*, 1986, 237: 231 - 239.
- [2] Lin H R, Peng C, Zhang W M, et al. Studies on growth rates and serum growth hormone levels in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [A]. Chan D K O, eds. *Hormones and the Environment, Proceedings of the International Symposium held at University of HongKong* [C]. Society for the Study of Endocrinology, Metabolism and Reproduction, Department of Medicine, University of Hongkong. 1989. 117 - 118.
- [3] Van Der Kraak G, Rosenbloom P, Peter R E. Growth hormone dependent potentiation of gonadotropin stimulated steroid production by ovarian follicles of the goldfish [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1990, 79: 233 - 239.
- [4] Le Gac F, Blaise O, Fosties A, et al. Growth hormone (GH) and reproduction: A review [J]. *Fish Physiol Biochem*, 1992, 11: 219 - 231.
- [5] Singh H, Thomas P. Mechanism of stimulatory action of growth hormone on ovarian steroidogenesis in spotted seatrout *Cynoscion nebulosus* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1993, 89: 341 - 353.
- [6] Stacey N E, Mackenzie D D, Marchant T A, et al. Endocrine changes during natural spawning in the whits sucker, *Catostomus commersoni* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1984, 56: 333 - 348.
- [7] Gomez J M, Loir M, Le Gac F. Growth hormone receptor in testis and liver during the spermatogenic cycle in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Biol Rep*, 1998, 58: 483 - 491.
- [8] Gomez J M, Mourou B, Fostier A, et al. Growth hormone receptors in ovary and liver during gametogenesis in female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *J Rep Fert*, 1999, 115: 275 - 285.
- [9] Sun X, Zhu S, Chan S S H, et al. Identification and characterization of growth hormone receptor in snakehead fish (*Ophiocephalus argus* Cantor) liver [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1997, 108: 374 - 385.
- [10] Shiu R P C, Friesen H G. Properties of a prolactin receptor from the rabbit mammary gland [J]. *Biochem J*, 1974, 140: 301 - 311.
- [11] 张为民, 张利红, 林浩然. 儿茶酚胺类药物对草鱼生长激素分泌的影响 [J]. *水生生物学报*, 1996, 20(4): 340 - 344.
- [12] Marchant T A, Cook A F, Peter R E. The relationship between circulating growth hormone levels and somatic growth in teleost species, *Carassius auratus* L [M]. Billard R, Marcel J, eds. *Aquaculture of Cyprinids*. INRA, Paris, 1986. 43 - 54.
- [13] Wagner G F, Mckeown B A. Development of a salmon growth hormone radio immunoassay [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1986, 62: 452 - 458.
- [14] 陈松林, 陈细华, 牟松, 等. 草鱼的生长及血清生长激素水平的季节性及其变化规律的研究 [J]. *水产学报*, 1998, 22(1): 30 - 35.
- [15] Bulow F J. RNA-DNA ratios as indicators of growth in fish: A review [A]. Robert C S, Gordon E H, eds. *The Age and Growth of Fish* [M]. The Iowa State University Press, Ames, Iowa 50010, 1987. 45 - 64.
- [16] Gray E S, Kelley K M. Growth regulation in the gobiid teleost, *Gillichthys mirabilis*: Roles of growth hormone, hepatic growth hormone receptors and insulin-like growth factor- I [J]. *J Endocrinol*, 1991, 131: 57 - 66.
- [17] Sauerwein H, Breir B, Bass J, et al. Chronic treatment with bovine growth hormone up-regulates high-affinity hepatic somatotrophic receptors in sheep [J]. *Acta Endocrinol*, 1991, 124: 307 - 313.
- [18] Yu K L, Peng C, Peter R E. Changes in brain levels of gonadotropin-releasing hormone and serum levels of gonadotropin and growth hormones in goldfish during spawning [J]. *Can J Zool*, 1991, 69: 1822 - 1828.