

# SRIF 及 CSH 对斜带石斑鱼脑垂体生长激素合成和分泌的调控\*

冉雪琴<sup>1,2</sup> 李文笙<sup>1,3</sup> 林浩然<sup>1,3\*\*</sup>

1. 中山大学生命科学院/水生经济动物研究所, 广州 510275
2. 贵州大学动物科学学院, 贵阳 550025
3. 广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广州 510275

**摘要** 斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 属于雌性先成熟、具有性转变的雌雄同体鱼类。生长激素释放抑制因子 (SRIF) 是鱼类生长激素 (GH) 分泌的主要抑制性调节剂, 半胱胺 (CSH) 可抑制 SRIF 的作用。本文采用静态孵育系统, 应用 RPA 及 RIA 研究 SRIF 及 CSH 对斜带石斑鱼 GH mRNA 表达及 GH 分泌的调节。结果显示, SRIF 能以剂量依存方式抑制斜带石斑鱼脑垂体释放 GH, 时间越长作用越强。但 SRIF 作用 24 h 对 GH mRNA 水平的影响不显著, 表明 SRIF 是斜带石斑鱼 GH 释放的抑制性调节剂, 对 GH mRNA 的表达没有明显影响。较低剂量的 CSH ( $10^{-4}$  -  $10^{-2}$  mol/L) 使斜带石斑鱼的 GH 释放量增加, 较高剂量 ( $10^{-1}$  mol/L) 的 CSH 引起的 GH 增加趋势减缓, 这种现象可能与较高剂量的 CSH 不仅抑制下丘脑 SRIF 的释放, 同时影响 GHRH 的释放, 使得 GH 的分泌量增幅下降有关; 无论是较高剂量还是较低剂量的 CSH 都不能使 GH mRNA 的水平增加, 表明 CSH 只能引起 GH 的释放量增加, 不影响 GH 的合成。GnRH 与 CSH 共同作用引起的 GH 释放量明显高于 CSH 单独作用的效应, 其主要原因是由于 GnRH 促进 GH mRNA 的表达所致 [动物学报 50 (2): 222 - 230, 2004]。  
**关键词** 斜带石斑鱼 生长激素 生长激素释放抑制因子 半胱胺 GH mRNA

## Regulation of the expression of growth hormone mRNA and the release of growth hormone by somatostatin and cysteamine in orange-spotted groupers *Epinephelus coioides*\*

RAN Xue-Qin<sup>1,2</sup>, LI Wen-Sheng<sup>1,3</sup>, LIN Hao-Ran<sup>1,3\*\*</sup>

1. College of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China
2. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China
3. Key Laboratory of Aquatic Economic Animals for Breeding and Reproduction, Guangdong Province, Guangzhou 510275, China

**Abstract** The regulation of growth hormone (GH) synthesis and secretion in teleosts is based on the dual control of hypothalamic stimulators, the gonadotropin-releasing hormone (GnRH), dopamine (DA), growth hormone-releasing hormone (GHRH), and the inhibitors, somatostatin (SRIF), norepinephrine (NE). SRIF is the main inhibitor of basal and neuroendocrine-stimulated GH release. Cysteamine (CSH) is a potent somatostatin depletor and promotes the growth of animal and grass carp obviously. Orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* is known as a benthic protogynous marine fish with sex inversion. The effects of SRIF and CSH on the GH release and GH mRNA expression in orange-spotted grouper still remain unclear. We studied whether SRIF and CSH modulate the release of GH and regulate the expression of GH mRNA in the pituitary of orange-spotted grouper. SRIF or CSH was incubated with the pituitary fragments of the orange-spotted grouper in static culture system. The GH content in the incubation medium was detected by homologous radioimmunoassay (RIA), and the GH mRNA level in the pituitary fragments was measured with RNase

2003-07-24 收稿, 2003-10-15 接受

\* 国家 863 资源与环境技术领域海洋生物技术主题资助课题 (No. 2001AA621110, 2001AA621010), 国家自然科学基金农业倾斜项目 (No. 39970586), 教育部科学技术研究重点资助项目 (No. 02150), 广东省自然科学基金团队项目 (No. 20023002) [ This research was funded by the National Marine 863 Projects of China (No. 2001AA621010, 2001AA621110), the National Natural Science Foundation Agricultural Program of China (No. 39970586), the Educational Ministry Key Project of Scientific and Technological Research (No. 02150), and Guangdong Provincial Natural Science Foundation Team Program (No. 20023002) ]

\*\* 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: ls32@zsu.edu.cn

© 2004 动物学报 Acta Zoologica Sinica

protection assay (RPA) taken digoxigenin-labelled antisense RNA as probe. The RPA could detect as little as 1 pg sense RNA or GH mRNA in 0.5  $\mu$ g total RNA of pituitary. SRIF ( $10^{-8}$  -  $10^{-6}$  mol/L) significantly inhibited the GH release at 2 h by 64.28% - 13.72% compared to the control group, and the inhibited effects was much more obvious at 24 h by only 3.3% - 2.36% of the control. CSH at doses of  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  and  $10^{-2}$  mol/L significantly increased the GH release at 2 h by 64.28% - 13.72% of the control. The CSH effect of  $10^{-1}$  mol/L was smaller than that of  $10^{-2}$  mol/L. The trend of higher dose of CSH with smaller effects was very apparent when the incubation duration was prolonged to 24 h.  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  and  $10^{-2}$  mol/L CSH increased GH release by 162.4% - 467% of control. GH content exposed to  $10^{-1}$  mol/L CSH was just 184.83% of control, which was comparable with that to  $10^{-4}$  mol/L CSH. It might be related to the reduction of GHRH from hypothalamus inhibited by CSH with higher dose. The effects of SRIF and CSH with any dose at 24 h on the GH mRNA level were not obvious compared with the control. These results showed that SRIF inhibited GH releases dose-dependently but did not affect the GH mRNA expression in the pituitary of orange-spotted grouper. CSH with lower dose increased the GH release from the pituitary of orange-spotted grouper but the trend of the increase of GH release was not kept at higher dose. CSH, which inhibited the effect of SRIF, did not affect the expression of GH mRNA level in the pituitary of orange-spotted grouper either. CSH co-cultured with sGnRH could enhanced both of the GH secretion and expression of GH mRNA. The effects of CSH and sGnRH was added and much more obvious than those of CSH or sGnRH alone [Acta Zoologica Sinica 50 (2): 222 - 230, 2004].

**Key words** Orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, Growth hormone, Somatostatin, Cysteamine, GH mRNA

鱼类生长激素 (Growth hormone, GH) 受神经内分泌-GH-胰岛素样生长因子轴的调控, 神经内分泌的抑制因子和促进因子共同调节 GH 的分泌。生长激素释放抑制因子 (Somatotrophin-release inhibiting factor, SRIF) 是最主要的抑制性神经内分泌因子, SRIF 及其受体的分布非常广泛, 在脑、外周神经系统及消化道都有分布, 但金鱼的下丘脑视前区是 SRIF 产生的主要部位 (Marchant et al., 1989)。SRIF 可抑制金鱼 (Kwong and Chang, 1997)、鲤鱼 (Lin et al., 1993) 和非洲鲶鱼 (Lescroart et al., 1996) 的 GH 释放, 但对斜带石斑鱼 GH 的调节机制尚不清楚。

通过神经内分泌系统调节 GH 水平的途径有两种, 一种是增加促 GH 分泌的内分泌因子的作用, 如 GnRH 能有效地刺激草鱼 GH 的分泌, 促进草鱼的生长 (Lin et al., 1995); 另外一种是以 SRIF 为主的抑制性因子对 GH 分泌的抑制作用, 间接提高 GH 水平。CSH 是半胱氨酸代谢的中间产物, 为辅酶 A 的组成成分之一。对哺乳类的研究表明, CSH 可降低 SRIF 的 mRNA 水平, 抑制 SRIF 的合成 (Papachristou et al., 1994), CSH 中的巯基和氨基等活性基团, 可破坏 SRIF 多肽结构中的二硫键, 改变 SRIF 的分子构型 (Kwok et al., 1992), 使大鼠脑内 SRIF 的免疫活性和生物活性快速下降 (Szabo and Reichlin, 1981), 解除对 GH 的抑制作用, 间接升高 GH 水平。低剂量的 CSH 通过口服或皮下注射能使绵羊 (McLeod et al., 1995)、大鼠 (Tannenbaum et al., 1990) 血液中的 GH 水平升高, 高剂量则使其下降。但 McElwain et al. (1999) 的研究表明, 较低剂量的 CSH 却使猪血液循环中的 GH 水平剂量式下降。

过高的 CSH 通过对 SRIF 的抑制, 使胃泌素增加, 胃液 pH 值下降, 导致消化道溃疡 (Drago and Montoneri, 1997)。

对哺乳动物的研究表明, 动物对 CSH 的反应性存在明显差异, CSH 的作用与施用剂量直接相关。Xiao and Lin. (2003) 对草鱼的研究表明, CSH 经腹腔注射或口服均可使草鱼血清中的 GH 水平上升。CSH 对海水鱼类 GH 的释放是否具有促进作用, 其作用机制如何尚未明了。斜带石斑鱼属于雌性先成熟、并具有性转变的雌雄同体鱼类, 天然状态下, 性转变大约需 2 - 3 年的时间, 对于临床上性别分化等研究是天然的模式动物, 因此, 研究其生长调节规律具有重要的生物学意义; 同时斜带石斑鱼是我国重要的海水养殖鱼类, 研究其生长调节方式能对石斑鱼养殖业的发展起到科学的指导作用, 故本文选用海水鱼的典型代表斜带石斑鱼研究 SRIF 及 CSH 对脑垂体 GH 分泌和 GH mRNA 水平的调控。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验用鱼

一龄斜带石斑鱼共 19 条购自广州市黄沙市场, 性腺处于未成熟期, 实验鱼体重 453 - 797 g, 体长 26 - 31 cm, 全长 30.5 - 36 cm。

### 1.2 药品及试剂

M199 购自 Gibco 公司 (USA), HEPES 购自 Sigma 公司 (USA)。生长抑素 (SRIF)、半胱胺 (Cysteamine hydrochloride, CSH, 结构式为 HS—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—NH<sub>2</sub>) 及 sGnRH 均购自 Sigma 公司 (USA)。实验前, 用 Earle's 盐缓冲液将 sGnRH 和 SRIF 配制成  $10^{-3}$  mol/L 的贮存液, CSH 配成 5

mol/L 贮存液, 分装后保存于  $-20^{\circ}\text{C}$ , 使用时, 用 M199 培养液稀释至所需浓度。TRIZOL Reagent 购自 Gibco 公司 (USA)。体外转录标记 RNA 试剂盒 (SP6/ T7)、CDP-Star 底物检测试剂盒及带正电荷的尼龙膜, 均为 Roche Applied Science (Germany) 产品, RNase A 为 Ambion (USA) 产品。其余为国产分析纯试剂。电转仪为 Pharmacia LKB Novablot (Sweden) 产品, X 光片为 Kodak (Japan) 产品。24 孔培养板购自 Falcon 公司 (France),  $\text{CO}_2$  培养箱为 SANYO (MCO-15A, Japan) 产品。

## 1.2 实验设计

### 1.2.1 SRIF、CSH 浓度梯度的影响

采用离体脑垂体碎块静态孵育系统研究 SRIF、CSH 对斜带石斑鱼 GH 分泌和合成的调节 (Li et al., 2002)。实验分为 11 种处理, 每种处理设 3 组, 每组所含样本量相当于三分之一垂体或/或下丘脑。实验所需的垂体和下丘脑切碎 (小于  $1\text{ mm}^3$ ), 将其平均分配, 使每个培养孔加入组织碎块的量相当于各三分之一下丘脑和/或垂体。孵育实验第 1 个处理为对照, 加入  $1\ \mu\text{L}$  M199 培养液; 第 2 - 5 个处理加入终浓度为  $10^{-4}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-1}$  mol/L CSH; 第 6 个处理只加入  $10^{-6}$  mol/L sGnRH; 第 7 个处理同时加入终浓度为  $10^{-2}$  mol/L CSH 和  $10^{-6}$  mol/L sGnRH (为了考察 CSH 与 GnRH 作用的叠加性, 二者均选择较高的作用浓度); 第 8 - 10 个处理分别加入终浓度为  $10^{-8}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$  mol/L SRIF; 第 11 个处理检测垂体的单独作用, 各培养孔中只加入约三分之一量的垂体碎块, 加入  $10^{-2}$  mol/L CSH。各组孵育 2 h 后, 每个培养孔取  $100\ \mu\text{L}$  孵育液,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存, 用于测定 CSH 及 SRIF 作用 2 h 垂体的 GH 分泌量。下丘脑、脑垂体碎块继续孵育至 24 h, 收集孵育液,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存, 待测 GH 含量; 收集下丘脑、脑垂体碎块, 参照 TRIZOL Reagent 说明书抽提总 RNA 和总 DNA, 检测 GH mRNA 变化。

### 1.2.2 CSH 和 SRIF 作用时间的影响

实验分为 8 个处理, 每个处理设 3 组, 第 1 - 4 个处理为对照, 加入  $1\ \mu\text{L}$  M199 培养液; 第 5 - 8 个处理加入终浓度为  $10^{-2}$  mol/L CSH, 各处理孵育 2、6、12、24 h 取孵育液和下丘脑及垂体碎块混合物样, 孵育液于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存, 待测 GH 含量, 下丘脑及垂体碎块混合物样提取总 RNA 和总 DNA, 检测 GH mRNA 变化。

## 1.3 放射免疫分析 (Radioimmunoassay, RIA) 及 RNase 保护性试验 (Ribonuclease Protection Assay, RPA)

采用同源 RIA 法测定孵育样品中的 GH 含量 (冉雪琴等, 2003), 结果表示为处理组累积 GH 含量与相应对照组累积 GH 含量的百分比。

下丘脑、垂体碎块中的 GH mRNA 含量采用非同位素的 RPA 测定, 在同位素 RPA 基础上做一定的改进 (李文笙、林浩然, 2000)。具体操作如下: 从含有斜带石斑鱼生长激素基因的重组质粒 pRGH6 (冉雪琴等, 2003) 中用限制性内切酶切下特异性的 195 bp DNA 片段, 克隆入质粒 pGEM-T Easy 相应位点, 筛选出阳性克隆 pG3, 序列测定确认核苷酸序列正确后, *Nde* 切割得到的线性化质粒 DNA 作为合成正义 RNA 的模板; *Xba* 切割得到的线性化质粒 DNA 作为合成反义 RNA 的模板, 经 SP6 RNA 聚合酶体外转录合成地高辛标记 (Digoxigenin labeled, Dig-) 的反义 RNA 片段长 254 nt, 用作 RPA 的反义 RNA 探针; T7 RNA 聚合酶体外转录合成的正义 RNA 片段长 279 nt, 用于 RPA 标准曲线的制作。正义 RNA 按 1 000、500、200、100、50、25、12.5、1 ng/ $\mu\text{L}$  梯度稀释, 于  $29\ \mu\text{L}$  杂交液 (40 mmol/L PIPES, 400 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 80% 去离子甲酰胺 (v/v), pH 6.4) 中加入  $1\ \mu\text{L}$  正义 RNA 稀释液或样品总 RNA (加入与  $1\ \mu\text{g}$  样品总 DNA 相当量的总 RNA), 每个样品设双平行管, 加入 1 ng 反义 RNA 探针, 于 85 - 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min 后 45  $^{\circ}\text{C}$  杂交过夜。加入 25 U RNase A, 30  $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min, 加入  $10\ \mu\text{L}$  20% SDS 终止反应, 加  $50\ \mu\text{g}$  蛋白酶 K, 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 15 min 降解 RNase, 加  $5\ \mu\text{g}$  酵母 tRNA, 1 ml 冷乙醇, 于  $-20^{\circ}\text{C}$  静置 30 min, 沉淀 RNA: RNA 二聚体, 10 000 r/min 离心 15 min, 收集沉淀, 空气干燥, 经 2% 琼脂糖电泳分离, 电转移法将 RNA: RNA 杂交体转移到带正电荷的尼龙膜上, 紫外交联仪 (Ultraviolet Crosslinker, CL-1000) 上交联 5 min, 固定 RNA 分子, 能量为 1 200  $\mu\text{J}$ 。68  $^{\circ}\text{C}$  洗膜 30 min, 加入 1% Blotto 封闭液 (Roche, Germany) 适量, 37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 1 h, 加入地高辛抗体 (1:20 000), 室温反应 30 min, 室温洗膜 30 min, 加入化学发光底物 CDP-Star 溶液 (1:100), 反应 30 min 后, X 光片曝光 15 min, 于凝胶成像系统上扫描, 用 Quantity one 软件对条带密度进行定量。根据标准曲线计算样品中的 GH

mRNA 含量, 结果表示为  $10^{-17}$  mol/ $\mu$ g DNA (% of control)。

#### 1.4 样品测定及数据处理

每个数据表示为 3 个重复实验的平均值  $\pm$  标准误差, 数据分析采用 SPSS 统计分析软件, 使用 Duncan's 法进行多重比较, 当  $P < 0.05$  时认为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 RNase 保护性试验

体外转录合成的 Dig-反义 RNA 探针和正义 RNA 的琼脂糖电泳检测见图 1, 以 *Nde* 线性化的模板, 经 T7 RNA 聚合酶体外转录合成的正义 RNA 长 279 nt, 以 *Xba* 线性化模板, SP6 RNA 聚合酶体外转录合成的反义 RNA 探针长 254 nt, 与样品 mRNA 将形成 195 bp RNA: RNA 杂交体, 与正义 RNA 形成 212 bp 杂交体 (图 2)。用地高辛标记的反义 RNA 探针与 1 - 1 000 pg/ $\mu$ l 正义 RNA 进行液相杂交反应 (图 3), 随着正义 RNA 浓度的提高, 杂交信号逐渐增强, 条带密度与正义 RNA 分子摩尔数之间具有良好的线性关系, 该系统最低可检出 1 pg/ $\mu$ l 正义 RNA 分子; 将垂体总 RNA 样品进行 2 倍稀释, 与反义 RNA 探针杂交, 可见随着样品总 RNA 量的减少, 杂交信号的密度呈逐渐下降趋势, 该系统可检出 0.5  $\mu$ g 垂体样品总 RNA 中的 GH mRNA 分子。

下丘脑垂体总 RNA 样品抽提结果显示 (图 4), 28S、18S 核糖体 RNA 条带清晰, 表明样品总 RNA 没有降解, 可以用于液相杂交反应检测垂体中 GH mRNA 水平的变化。

### 2.2 SRIF 及 CSH 浓度的对 GH 分泌和合成的影响

$10^{-8}$  mol/L、 $10^{-7}$  mol/L、 $10^{-6}$  mol/L 的 SRIF 作用离体孵育的斜带石斑鱼脑垂体 2 h 即可使 GH 分泌量明显低于对照 (图 5A), 分别为对照处理 GH 含量的 64.28%  $\pm$  12%、38.99%  $\pm$  10%、13.72%  $\pm$  6% (2 h 对照处理 GH 含量为 140.87  $\pm$  2.68 ng/ml 孵育液), 并且随着 SRIF 浓度的增加, GH 含量逐渐下降, 呈现出明显的剂量依存关系;



图 1 体外转录合成的反义 RNA 探针和正义 RNA 电泳分析  
1: 反义 RNA 探针。2: 正义 RNA。

Fig. 1 Detection of the Dig-antisense RNA probe and sense-RNA in in vitro transcription

1: Antisense RNA probe, 254 nt. 2: Sense-RNA, 279 nt.

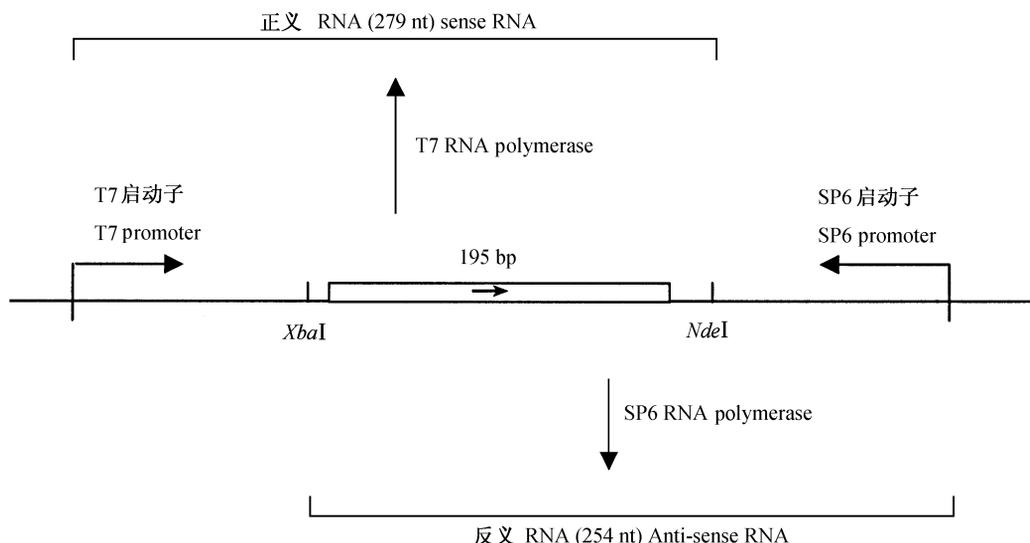


图 2 反义 RNA 探针与正义 RNA 合成示意图

Fig. 2 The construction of antisense RNA probe and sense RNA

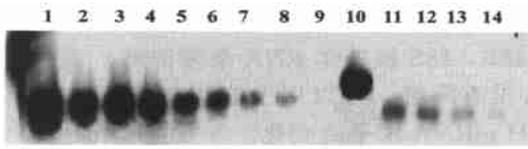


图3 GH mRNA 表达的检测

1-8: 1 000、500、200、100、50、25、12.5 至 1 pg/μl 正义 RNA 梯度。9: 阴性对照。10: 阳性对照。11-14: 5 μg、2.5 μg、1 μg、0.5 μg 斜带石斑鱼垂体总 RNA。

Fig. 3 Detection of the expression of GH mRNA gene

1-8: Sense-RNA, 1 000, 500, 200, 100, 50, 25, 12.5 to 1 pg/μl respectively. 9: Negative control. 10: positive control. 11-14: Total RNA from the pituitary of orange-spotted grouper 5 μg, 2.5 μg, 1 μg, 0.5 μg respectively.

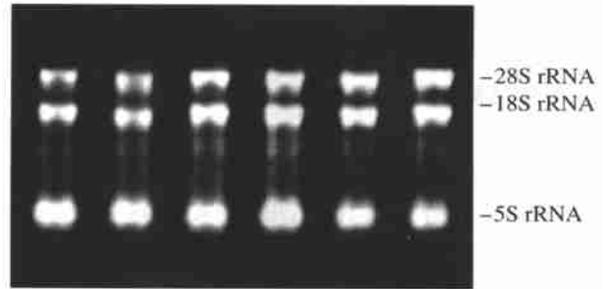


图4 斜带石斑鱼脑垂体总 RNA 样品琼脂糖电泳分析

1 至 6 泳道代表 6 个培养孔中加入的总 RNA 样品量。

Fig. 4 Total RNA from the pituitary of grouper

Lane 1 to Lane 6 showed that the content of total RNA added into every well was equivalent.

$10^{-8}$  mol/L、 $10^{-7}$  mol/L、 $10^{-6}$  mol/L SRIF 作用 24 h (图 5B), GH 含量下降得更加明显, 分别为对照处理的  $3.3\% \pm 0.8\%$ 、 $2.78\% \pm 0.6\%$ 、 $2.36\% \pm 0.2\%$ , 对照处理 (24 h) GH 含量为  $224.6 \pm 19.34$  ng/ml 孵育液。结果表明 SRIF 能以剂量依存方式降低斜带石斑鱼脑垂体 GH 的释放, 时间越长作用越强。

$10^{-8}$  mol/L、 $10^{-7}$  mol/L、 $10^{-6}$  mol/L 的 SRIF 作用 24 h, 对离体孵育的斜带石斑鱼脑垂体碎块 GH mRNA 水平的影响与对照处理相比, 变化不明显 ( $P > 0.05$ ) (图 5C), 分别为对照处理 GH 含量的  $105.16\% \pm 21\%$ 、 $126.68\% \pm 16\%$ 、 $91.072\% \pm 24\%$  [24 h 对照处理 GH mRNA 水平为  $(3.55 \pm 0.91) \times 10^{-17}$  mol/μg DNA], 结果表明, SRIF 对离体孵育的斜带石斑鱼脑垂体 GH mRNA 的表达无明显影响。

$10^{-2}$  mol/L 的 CSH 单独与垂体碎块孵育 2 h 或 24 h 均不能使 GH 的分泌量有明显增加。下丘脑与垂体碎块共同孵育时,  $10^{-4}$  mol/L、 $10^{-3}$  mol/L、 $10^{-2}$  mol/L、 $10^{-1}$  mol/L 的 CSH 作用 2 h, 垂体碎块的 GH 分泌量明显高于对照处理 (图 6A), 分别为对照处理 GH 含量的  $193.5\% \pm 16\%$ 、 $206\% \pm 11\%$ 、 $228\% \pm 2\%$ 、 $205.32\% \pm 24\%$  (2 h 对照处理 GH 含量为  $120.6 \pm 38.04$  ng/ml 孵育液); 随着 CSH 作用浓度从  $10^{-4}$  mol/L 增加到  $10^{-2}$  mol/L, GH 含量逐渐增加, 但变化趋势缓慢,  $10^{-1}$  mol/L CSH 使 GH 升高的幅度没有  $10^{-2}$  mol/L CSH 大;  $10^{-2}$  mol/L CSH 与  $10^{-6}$  mol/L sGnRH 共同作用和 sGnRH 单独作用的效应明显高于对照处理, 但与  $10^{-2}$  mol/L CSH 的作用相当; 这种变化趋势在 CSH 作用 24 h 时有所改变 (图

6B):  $10^{-4}$  mol/L、 $10^{-3}$  mol/L、 $10^{-2}$  mol/L CSH 引起的 GH 含量分别是对照处理 (24 h) 的  $162.4\% \pm 20\%$ 、 $273.5\% \pm 21\%$ 、 $467\% \pm 35\%$  (24 h 对照处理 GH 含量为  $211.6 \pm 17.17$  ng/ml 孵育液), 随着 CSH 作用浓度从  $10^{-4}$  mol/L 增加到  $10^{-2}$  mol/L, GH 分泌量明显呈剂量式增加, 而  $10^{-1}$  mol/L 的 CSH 引起的 GH 分泌量明显小于  $10^{-2}$  mol/L CSH ( $P < 0.05$ ), 只与  $10^{-4}$  mol/L CSH 的作用相当。 $10^{-2}$  mol/L CSH 与  $10^{-6}$  mol/L sGnRH 共同作用的效应为  $983\% \pm 39\%$ , 明显高于  $10^{-6}$  mol/L sGnRH 单独作用和  $10^{-2}$  mol/L CSH 单独作用的效果, 分别为  $382\% \pm 43\%$ 、 $467\% \pm 25\%$ , 就数值而言, 在 sGnRH 和 CSH 共同作用处理中, sGnRH 和 CSH 的作用具有叠加性。

$10^{-4}$  mol/L、 $10^{-3}$  mol/L、 $10^{-2}$  mol/L、 $10^{-1}$  mol/L CSH 作用 24 h 时, 离体孵育斜带石斑鱼脑垂体中 GH mRNA 的含量与对照处理相比, 变化不明显 ( $P > 0.05$ ) (图 6C), 分别为对照处理 GH mRNA 含量的  $120.44\% \pm 20\%$ 、 $98.21\% \pm 18\%$ 、 $118.8\% \pm 16\%$ 、 $87\% \pm 22\%$  [24 h 对照处理 GH mRNA 含量为  $(3.55 \pm 0.91) \times 10^{-17}$  mol/μg DNA], 结果表明 CSH 并不升高离体孵育斜带石斑鱼脑垂体的 GH mRNA 水平。 $10^{-2}$  mol/L CSH 与  $10^{-6}$  mol/L sGnRH 共同作用的效应与 sGnRH 的单独作用相当, 均使 GH mRNA 的表达量明显增加, 分别为对照处理的  $200.821\% \pm 20\%$ 、 $207.384\% \pm 22\%$ 。

### 2.3 CSH 作用时间对 GH 分泌和合成的影响

随着作用时间的延长,  $10^{-2}$  mol/L CSH 使离体孵育斜带石斑鱼脑垂体 GH 分泌量呈逐渐上升趋势 (图 7A), 分别为 2 h 对照处理的  $452.5\% \pm$

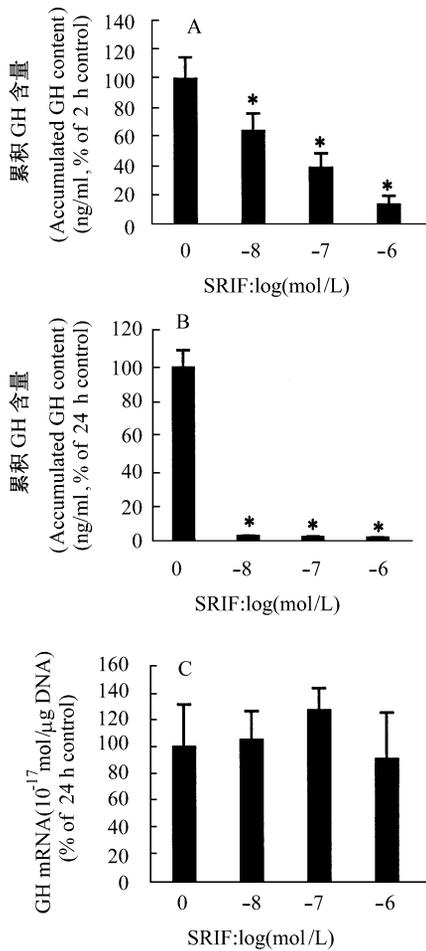


图 5 SRIF 作用浓度对斜带石斑鱼 GH 分泌及 mRNA 表达的影响

A. SRIF 作用 2 h 时斜带石斑鱼脑垂体 GH 的累积分泌量变化。B. SRIF 作用 24 h 时斜带石斑鱼脑垂体 GH 的累积分泌量变化。C. SRIF 作用 24 h 时斜带石斑鱼脑垂体碎片 GH mRNA 水平变化, 下方为各处理的 RPA 电泳图。\*: 差异显著 (Duncan's test,  $P < 0.05$ )。

Fig. 5 Effects of SRIF at different concentration on the GH secretion and GH mRNA level in the pituitary of orange-spotted grouper

A. Accumulated GH content from the pituitary fragments incubated with SRIF for 2 h. B. Accumulated GH content incubated with SRIF for 24 h. C. The level of GH mRNA in the pituitary fragments incubated with SRIF for 24 h. The chemiluminescent signals parallel with the level of GH mRNA in RPA were showed under Fig. C. \*: Significant difference (Duncan's test,  $P < 0.05$ ).

23.2%、546% ±32.1%、677.4% ±17%、671.8% ±30%、2 h 对照处理的 GH 含量为 98.2 ±12.67 ng/ml 孵育液, CSH 作用 2 h 到 12 h, GH 含量呈剂量

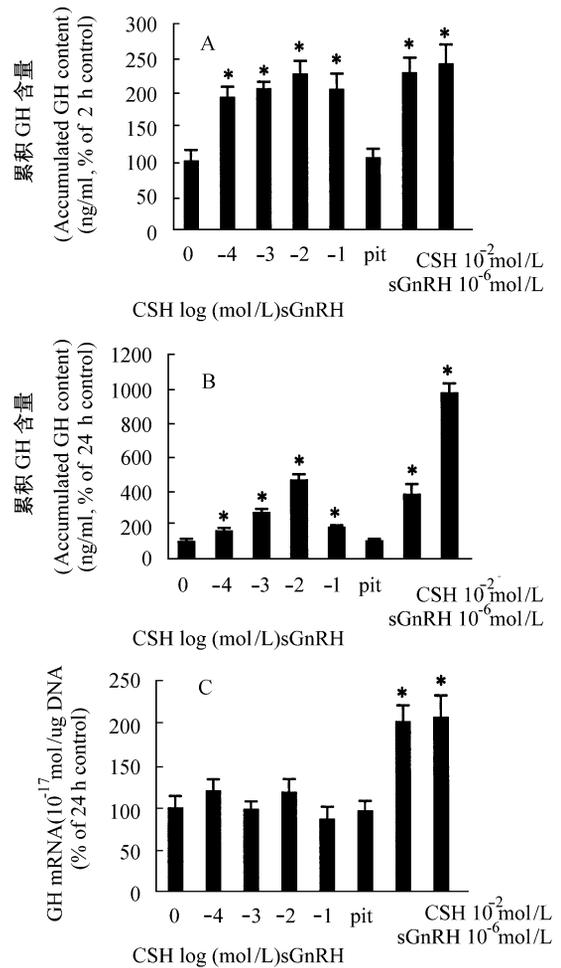


图 6 CSH 作用浓度对斜带石斑鱼 GH 分泌及 mRNA 表达的影响

A. CSH 作用 2 h 时斜带石斑鱼脑垂体 GH 的累积分泌量变化。B. CSH 作用 24 h 时斜带石斑鱼脑垂体 GH 的累积分泌量变化。C. CSH 作用 24 h 时斜带石斑鱼脑垂体碎片 GH mRNA 水平变化, 下方为各处理的 RPA 电泳图。\*: 差异显著 (Duncan's test,  $P < 0.05$ )。

Fig. 6 Effects of CSH at different concentration on the GH secretion and GH mRNA change in the pituitary of orange-spotted grouper

A. Accumulated GH content from the pituitary fragments incubated with CSH for 2 h. B. Accumulated GH content incubated with CSH for 24 h. C. The level of GH mRNA in the pituitary fragments incubated with CSH for 24 h. The chemiluminescent signals parallel with the level of GH mRNA in RPA were showed under Fig. C. \*: Significant difference (Duncan's test,  $P < 0.05$ ).

式上升, 12 h 至 24 h 之间相当, 形成一个平台。结果表明, CSH 以时间依存方式促进斜带石斑鱼脑垂体释放 GH。

随着作用时间的延长,  $10^{-2}$  mol/L CSH 对离体孵育斜带石斑鱼脑垂体 GH mRNA 的作用与对照相比不显著 ( $P > 0.05$ ) (图 7B), 分别为 2 h 对照处理的  $102.8\% \pm 15.2\%$ 、 $93.4\% \pm 8.3\%$ 、

$94.28\% \pm 10.5\%$ 、 $96.8\% \pm 7.8\%$ , 2 h 对照处理的 GH mRNA 含量为  $(3.64 \pm 0.26) \times 10^{-17}$  mole/ $\mu$ g DNA。结果表明 CSH 不影响斜带石斑鱼脑垂体 GH mRNA 的表达。

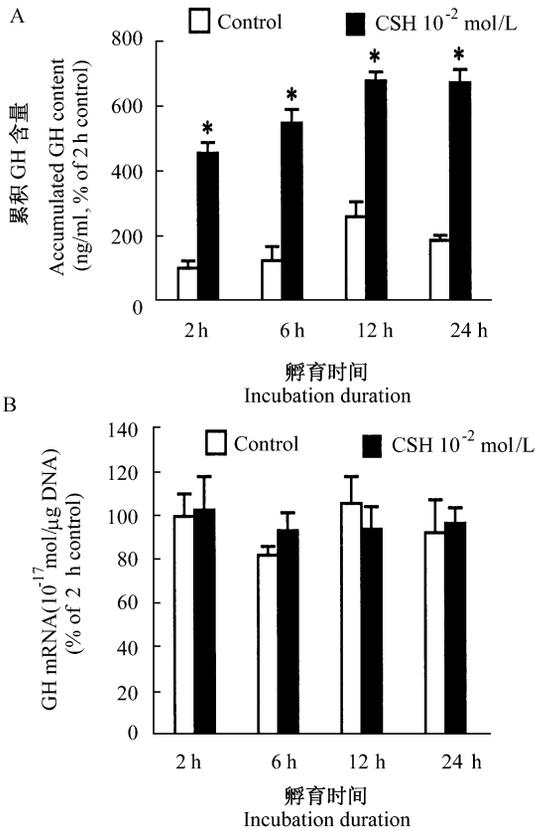


图 7 CSH 作用时间对斜带石斑鱼脑垂体 GH 分泌和 GH mRNA 水平的影响

A.  $10^{-2}$  mol/L CSH 处理不同时间 GH 的累积分泌量变化。B.  $10^{-2}$  mol/L CSH 处理不同时间 GH mRNA 水平变化, 下方为各处理的 RPA 电泳图。\*: 差异显著 (Duncan s test,  $P < 0.05$ )。

Fig. 7 Effects of CSH in different duration on the GH secretion and the expression of GH mRNA in the pituitary of orange-spotted grouper

A. Accumulated GH content from the pituitary fragments incubated with  $10^{-2}$  mol/L CSH. B. The level of GH mRNA in the pituitary fragments incubated with  $10^{-2}$  mole/L CSH. The chemiluminescent signals parallel with the level of GH mRNA in RPA were showed under Fig.B. \*: Significant difference (Duncan s test,  $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

SRIF 以剂量依存方式抑制斜带石斑鱼脑垂体的 GH 释放, 作用时间越长作用越强 (图 5), 表明 SRIF 是斜带石斑鱼脑垂体 GH 释放的抑制性调节剂。与金鱼 (Kwong and Chang, 1997)、鲤鱼 (Lin et al., 1993) 和非洲鲶鱼 (Lescroart et al., 1996) 等的研究结果一致。与 GH 调节关系密切的 SRIF 的三种受体  $sst_1$ 、 $sst_2$ 、 $sst_5$  在金鱼垂体上都有分布 (Lin et al., 1999, 2000, 2002)。对哺乳类的研究表明, SRIF 通过腺垂体 GH 细胞上的  $sst$  受体直接抑制 GH 的释放; 或通过弓状核上的  $sst_2$  受体抑制 GHRH 的合成 (Epelbaum, 1992) 和释放, 间接抑制 GH 的释放 (Zheng et al., 1997)。本实验中应用下丘脑和垂体碎块共同孵育, SRIF 对 GH 的直接抑制和通过 GHRH 对 GH 的间接抑

制可能同时存在。

将放射性标记的亮氨酸加入虹鳟垂体的孵育液中, 测定放射性标记亮氨酸掺入垂体中的含量, 证明 SRIF 能影响 GH 的合成, 但可能是在翻译水平 (Yada and Hirano, 1992)。本文研究结果证实 SRIF 不影响斜带石斑鱼脑垂体 GH mRNA 的表达水平。SRIF 可使罗非鱼 (Melamed et al., 1996) 垂体 cAMP 水平降低, 但降低的 cAMP 水平只能减少 GH 的释放, 不降低 GH mRNA 的表达水平。

SRIF 的抑制剂 CSH 对斜带石斑鱼 GH 分泌的研究结果表明, 较低剂量 ( $10^{-4}$  -  $10^{-2}$  mol/L) 的 CSH 能以剂量方式和时间依存方式促进斜带石斑鱼离体脑垂体分泌 GH;  $10^{-6}$  mol/L sGnRH 与  $10^{-2}$  mol/L CSH 共同作用 24 h 的效应明显高于  $10^{-6}$  mol/L sGnRH 单独作用和  $10^{-2}$  mol/L CSH 单独作用 ( $P < 0.05$ ), sGnRH 促进 GH 分泌的作用

与 CSH 对 GH 分泌的促进作用具有叠加效应。这些结果与草鱼的研究结果相似 (肖东等, 1999), 无论是腹腔注射还是口服, CSH 能以剂量依存方式升高草鱼的 GH 水平, 明显促进草鱼的生长。哺乳类的研究表明, CSH 可能通过几种不同的方式影响 GH 的释放: 第一, CSH 改变 SRIF 的结构 (Kwok et al., 1992), 抑制 SRIF 与腺垂体 GH 细胞上的 sst 受体的结合 (Harvey et al., 1990), 使 SRIF 免疫活性快速但可逆性地丧失 (McLeod et al., 1995), 解除 SRIF 对 GH 分泌的抑制作用, 从而使垂体 GH 的释放量增加; 第二, CSH 提高脑内  $\alpha$ -内啡肽水平, 促进 GH 的分泌。采用慢性颈静脉血管瘘管研究 CSH 对猪 GH 及有关代谢激素的调节, 结果表明 CSH 能消耗 SRIF 并提高  $\alpha$ -内啡肽水平, 促进 GH 的分泌 (姜礼胜等, 2002)。第三, CSH 抑制多巴胺-羟化酶的活性, 导致多巴胺含量显著升高, 通过多巴胺的作用促进 GH 的合成和分泌 (Terry and Craig, 1985)。本文的繁育实验应用的是下丘脑和垂体碎块的混合物, CSH 的三种作用方式可能同时存在。CSH 对斜带石斑鱼脑垂体 GH mRNA 的表达水平没有明显的作用, 这一结果可能与 CSH 主要抑制 SRIF 的活性有关, SRIF 不抑制 GH mRNA 的表达, 所以无论较低剂量还是较高剂量的 CSH, 都不影响斜带石斑鱼 GH mRNA 的表达。GnRH 单独或与 CSH 共同作用引起斜带石斑鱼 GH mRNA 明显增加, 而 CSH 单独作用却对 GH mRNA 水平没有明显影响, 表明 sGnRH 与 CSH 的共同作用组中, sGnRH 引起的 GH 释放量增加主要由于 GnRH 对 GH mRNA 表达的促进作用所致, CSH 则主要促进 GH 的分泌, 不影响 GH mRNA 的表达, sGnRH 和 CSH 以不同的调节机制促进 GH 的分泌, 二者的作用具有叠加性。

低剂量的 CSH 能以剂量方式促进斜带石斑鱼脑垂体释放 GH, 而高剂量的 CSH ( $10^{-1}$  mol/L) 对斜带石斑鱼脑垂体 GH 释放的促进作用明显减弱。本文结果与哺乳类的研究结果相似, 在绵羊食团中掺入 50 mg/kg BW 的 CSH, 血清中的 GH 明显上升; 掺入 100 mg/kg BW CSH 血清中的 GH 含量反而下降 (McLeod et al., 1995)。大鼠中也存在类似的现象, 大鼠皮下注射 90 mg/kg BW CSH 时, 循环中的 GH 含量上升, 注射 300 mg/kg BW 的 CSH 则使血清中的 GH 含量明显下降, 并且证实 300 mg CSH/kg BW 降低大鼠垂体门脉中的

SRIF 和 GHRH 浓度 (Tannenbaum et al., 1990)。较高剂量的 ( $10^{-1}$  mol/L) CSH 使斜带石斑鱼垂体 GH 增加的幅度减缓可能与下丘脑 GHRH 水平的下降有关。

综合上述研究结果, 高浓度的 CSH 引起的 GH 分泌量增加效应会随着时间的延长而下降, 较高浓度的 CSH ( $10^{-2}$  mol/L) 与 GnRH 共同作用可使斜带石斑鱼垂体的 GH 分泌量明显增加, 二者的效应具有叠加性。CSH 结构简单, 生产成本低, 与 GnRH 共同作用能明显促进斜带石斑鱼垂体分泌 GH, 因此 CSH 在促进重要海水养殖鱼类的生长中是很有前景的饲料添加剂。

### 参考文献 (References)

- Drago F, Montoneri C, 1997. Influence of growth hormone on cysteamine-induced gastroduodenal lesions in rats, the involvement of somatostatin. *Life Sciences* 61 (1): 21 - 28.
- Epelbaum J, 1992. Intrahypothalamic neurohormonal interactions in the control of growth hormone secretion. *Ciba Found Symp.* 168: 54 - 64.
- Harvey S, Baidwan JS, Attardo D, 1990. Homologous and heterologous regulation of somatostatin-binding sites on chicken adenohypophysial membranes. *J. Endocrinol.* 127 (3): 417 - 425.
- Jiang LH, Chen J, Chen WH, 2002. Influence of cysteamine on the porcine GH pulsatile secretion and related metabolic hormone. *Chinese J. Vet. Sci.* 22 (3): 262 - 264 (In Chinese).
- Kwok RS, Cameron JL, Faller DV, 1992. Effects of cysteamine administration on somatostatin biosynthesis and levels in rat hypothalamus. *Endocrinology* 131: 2 999 - 3 009.
- Kwong P, Chang JP, 1997. Somatostatin inhibition of growth hormone release in goldfish: possible targets of intracellular mechanisms of action. *Gen. Comp. Endocrinol.* 108: 446 - 456.
- Lescroart O, Roelants I, Milolajczyk T, 1996. A radioimmunoassay for African catfish growth hormone: validation and effects of substances modulating the release of growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 104: 147 - 155.
- Li WS, Lin HR, Wong AOL, 2002. Effects of gonadotropin-releasing hormone on growth hormone secretion and gene expression in common carp pituitary. *Comp. Biochem. Physiol.* 132 B: 335 - 341.
- Li WS, Lin HR, 2000. Effects of sex steroid on the growth hormone (GH) gene expression in the pituitary of common carp *Cyprinus carpio*. *Acta Zool. Sin.* 46 (2): 175 - 182 (In Chinese).
- Lin XW, Janovick JA, Brothers S, Conn PM, Peter RE, 1999. Molecular cloning and expression of two type one somatostatin receptors in goldfish brain. *Endocrinology* 140: 5 211 - 5 219.
- Lin XW, Janovick JA, Cardenas R, Conn PM, Peter RE, 2000. Molecular cloning and expression of a type-two somatostatin receptor in goldfish brain and pituitary. *Molecular and Cellular Endocrinology* 166: 75 - 87.
- Lin XW, Lin HR, Peter RE, 1993. Growth hormone and gonadotropin secretion in the common carp *Cyprinus carpio* L.: *in vitro* interactions of gonadotropin-releasing hormone, somatostatin, and the dopamine agonist apomorphine. *Gen. Comp. Endocrinol.* 89: 62 - 71.
- Lin XW, Nunn C, Hoyer D, Rivier J, Peter RE, 2002. Identification and characterization of a type five-like somatostatin receptor in goldfish pituitary. *Molecular and Cellular Endocrinology* 189: 105 - 116.
- Lin HR, Zhang Q, Peter RE, 1995. Effects of recombinant tuna growth hormone (GH) and analogs of gonadotropin-releasing hor-

- none (GnRH) on growth of grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. *Aquaculture* 129: 341 - 343.
- Marchant TA, Chang JP, Nahorniak CS, Peter RE, 1989. Evidence that gonadotropin-releasing hormone also functions as a growth hormone-releasing factor in the goldfish. *Endocrinology* 124: 2 509 - 2 518.
- McElwain KV, Estienne MJ, Barb CR, 1999. Effect of cysteamine hydrochloride on secretion of growth hormone in male swine. *Life Sciences* 64 (24): 2 233 - 2 238.
- McLeod KR, Harmon DL, Schillo KK, Mitchell GE, Jr, 1995. Cysteamine-induced depletion of somatostatin in sheep: time course of depletion and changes in plasma metabolites, insulin, and growth hormone. *J. Anim. Sci.* 73: 77 - 87.
- Melamed P, Gur G, Elizur A, Rosenfeld H, Sivan B, Rentier-Delrue F, Yaron Z, 1996. Differential effects of gonadotropin-releasing hormone, dopamine and somatostatin and their second messengers on the mRNA levels of gonadotropin subunit and growth hormone in the teleost fish, tiplapia. *Neuroendocrinology* 64: 320 - 328.
- Papachristou DN, Liu JL, Patel YC, 1994. Cysteamine-induced reduction in tissue somatostatin immunoreactivity is associated with alterations in somatostatin mRNA. *Regul. Pept.* 49 (3): 237 - 247.
- Ran XQ, Li WS, Lin HR, 2003. Application of the recombinant growth hormone and its antibody in the development of radioimmunoassay in orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*. *Acta Zool. Sin.* 49 (5): 663 - 669 (In Chinese).
- Szabo S, Reichlin S, 1981. Somatostatin in rat tissues is depleted by cysteamine administration. *Endocrinology* 109: 2 255 - 2 257.
- Tannenbaum GS, McCarthy GF, Zeitler P, Beaudet A, 1990. Cysteamine-induced enhancement of growth hormone-releasing factor (GRF) immunoreactivity in arcuate neurons: morphological evidence for putative somatostatin/GRF interactions within hypothalamus. *Endocrinology* 127: 2 551 - 2 560.
- Terry LC, Craig R, 1985. Cysteamine effects on monoamines, dopamine-beta-hydroxylase and the hypothalamic-pituitary axis. *Neuroendocrinology* 41 (6): 467 - 475.
- Xiao D, Lin HR, 2003. Effects of cysteamine—a somatostatin-inhibiting agent—on serum growth hormone levels and growth in juvenile grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 134 A: 93 - 99.
- Xiao D, Chen SL, Chen XH, Deng WT, Lin HR, 1999. Effects of somatostatin inhibiting agent CSH on the serum growth hormone level in crucian carp *Carassius auratus gibelio*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatsen* 38 (6): 120 - 122 (In Chinese).
- Yada T, Hirano T, 1992. Inhibition of growth hormone synthesis by somatostatin in cultured pituitary of rainbow trout. *J. Comp. Physiol. B* 162: 575 - 580.
- Zheng H, Bailey A, Jiang MH, Honda K, Chen HY, Trumbauer ME, Vanderploeg LHT, Schaeffer JM, Leng G, Smith RG, 1997. Somatostatin receptor subtype 2 knockout mice are refractory to messenger growth hormone-negative feedback on arcuate neurons. *Mol. Endocrinol.* 11: 1 709 - 1 717.
- 姜礼胜, 陈杰, 陈伟华, 2002. 半胱胺对生长猪生长激素脉冲释放及有关代谢激素的影响. *中国兽医学报* 22 (3): 262 - 264.
- 李文笙, 林浩然, 2000. 性类固醇激素对鲤鱼脑垂体生长激素基因表达的影响. *动物学报* 46 (2): 175 - 182.
- 冉雪琴, 李文笙, 林浩然, 2003. 重组斜带石斑鱼生长激素及其抗血清在放射免疫测定中的应用. *动物学报* 49 (5): 663 - 669.
- 肖东, 陈松林, 陈细华, 邓文涛, 林浩然, 1999. CSH对银鲫血清生长激素水平影响的研究. *中山大学学报*, 38 (6): 120 - 122.