

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*

冉雪琴 李文笙 林浩然**

(中山大学水生经济动物研究所暨广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广州 510275)

(贵州大学动物科学学院, 贵阳 550025)

摘要 将斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 生长激素成熟多肽 cDNA 序列克隆到质粒 pRSET, 与 6x 组氨酸等原核编码序列融合获得重组质粒 pRGH6, 转入大肠杆菌 BL21 (DE3), 获得高效表达, 表达量占细菌总蛋白的 43%。免疫印迹证明表达产物为含斜带石斑鱼生长激素的融合蛋白, Ni^{2+} 亲和层析柱纯化融合蛋白, 以此为抗原免疫家兔制备特异性的抗血清。以纯化的重组生长激素和特异性的抗血清建立斜带石斑鱼生长激素的放射免疫测定法, 该方法的灵敏度、特异性和重复性均达到测定血液生长激素的水平。研究了多巴胺的受体激动剂阿扑吗啡对静态孵育斜带石斑鱼脑垂体碎片释放生长激素的影响, 结果表明, 阿扑吗啡能以剂量依存方式促进斜带石斑鱼垂体释放生长激素 [动物学报 49 (5): 663~669, 2003]。

关键词 斜带石斑鱼 生长激素 阿扑吗啡 脑垂体碎片 放射免疫测定法

Application of the recombinant growth hormone and its antibody in the development of radioimmunoassay in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)*

RAN Xue-Qin LI Wen-Sheng LIN Hao-Ran**

(Institute of Aquatic Economic Animals and Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic Animals,
Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

(College of Animal Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract In order to determine the effects of apomorphine (APO) on growth hormone (GH) release from the pituitary of the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*), We established a radioimmunoassay (RIA) by using recombinant growth hormone (rgGH) of the grouper and its specific antiserum. GH cDNA of orange-spotted grouper was cloned into a prokaryotic expression vector pRSET and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells in a form of fusion protein. Its yield was estimated to be 43% of the total bacterial proteins. The GH fusion protein was purified by Ni^{2+} -chelated affinity chromatography and the antiserum was prepared by using the purified protein as an antigen to immune a rabbit. The recombinant rgGH was iodinated with Iodine-125 in lactoperoxidase method. The results showed that the sensitivity of the RIA was 15.625 pg. Inter- and intra-assay coefficients of variation (CV) were 4.24% and 8.07% respectively. Recombinant carp GH and goldfish prolactin did not show cross-reactivity with rgGH. Serial dilution curve of incubation medium samples was parallel to the standard curve of rgGH. The recombinant rgGH contained fusion partner in the N-terminal of the protein, but it did not affect the sensitivity and precision of the RIA. According to the results, the established RIA can be used to detect GH in orange-spotted grouper.

2002-09-08 收稿, 2003-05-07 修回

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

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

第一作者简介 女, 35 岁, 副教授, 博士。研究方向: 鱼类生长的内分泌调控及基因表达调控。E-mail: ranxq@hotmail.com

The pituitary fragments of orange-spotted grouper were incubated with APO, the D₁/D₂ dopamine receptor agonist, and the *in vitro* effects of APO on the GH release were detected by the established grouper GH RIA. 10^{-6} mol/L APO obviously stimulated the GH release from the pituitary fragments after 12 hr and 24 hr of incubation. APO (10^{-7} , 10^{-6} mol/L) stimulated the GH release in a dose-dependent manner after 12 hr of incubation. It reached 232.78 ± 14.11 ng/ml and 324.15 ± 79.2 ng/ml (mean \pm SE, $n=3$) respectively, and the control was 149.72 ± 5.84 ng/ml (mean \pm SE, $n=3$). These results demonstrate that dopamine receptor D₁/D₂ agonist, APO, stimulates GH release at the pituitary levels in orange-spotted grouper as in other teleosts and that dopamine receptor D₁ might be present in the regulation of GH release in grouper [Acta Zoologica Sinica 49 (5): 663-669, 2003].

Key words Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*), Growth hormone, Apomorphine, Pituitary fragments, Radioimmunoassay

鱼类的生长激素 (Growth hormone, GH) 为腺垂体嗜酸性细胞分泌的单链多肽, 主要功能是调节鱼体的生长发育, 促进蛋白质的合成和脂肪分解 (林浩然, 1996), 并参与渗透压调节和水盐平衡 (Sakamoto *et al.*, 1997)。Farmer *et al.* (1976) 首次从莫桑比克罗非鱼垂体中分离出生长激素, 随后鲈鱼 (徐斌等, 1998)、草鱼 (陈松林等, 1995) 等多种鱼类的生长激素相继分离纯化。从脑垂体中分离纯化生长激素需要大量的样品, 纯化步骤繁琐, 300 个鲈鱼脑垂体经匀浆、碱性凝胶过滤、反相高压液相层析等过程, 仅得到约 1.1 mg 纯品 (Jackson *et al.*, 2000)。近年来, 基因工程技术为 GH 的纯化带来了突破性的进展, Sekine *et al.* (1985) 最早从大马哈鱼脑垂体 cDNA 文库中克隆了生长激素 cDNA, 并在大肠杆菌中表达, 鱼类基因重组生长激素同样具有促进生长的活性 (Lin *et al.*, 1995)。重组金头鲷 GH 的放射免疫测定法 (Radioimmunoassay, RIA) 与天然 GH RIA 具有相同的灵敏度和特异性 (Barbera *et al.*, 1995)。迄今, 非洲鲷鱼 (Lescroart *et al.*, 1996) 和罗非鱼 (Melamed *et al.*, 1995) 等重组生长激素的 RIA 已建立, 促进了这些鱼类生长发育调控机理等方面的研究。

斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 属鲈形目 (Perciformes), 鲷科 (Serranidae), 主要分布于沿海近礁水域, 为雌性先熟并具有性转变的雌、雄同体鱼类, 是我国华南沿海一带及东南亚地区重要的海水养殖鱼种, 建立特异性强、灵敏度高的 GH 测定方法是系统深入研究石斑鱼生长发育调控机理的先决条件。斜带石斑鱼的苗种培育是养殖生产持续发展的关键, 但目前对其生长发育的内分泌调控还了解得很少。为此, 我们在克隆了斜带石斑鱼 GH 基因的基础上, 将斜带石斑鱼 GH 基因在大肠杆菌中表达, 纯化重组生长激素, 建立了斜带石斑鱼的同源放射免疫测定法。

1 材料和方法

1.1 实验动物

1 龄斜带石斑鱼购自广州市黄沙市场, 性腺发育处于未成熟期, 体重 420 ~ 670 g, 体长 29 ~ 36 cm。新西兰大耳兔购自广州市白云区实验动物养殖中心。

1.2 菌株及质粒

质粒 pGH5 (含斜带石斑鱼生长激素基因, GeneBank No. A Y038606) 由本室构建, 表达质粒 pRSET 及其受体细胞 BL21 (DE3) (F^{omp} Tr^B m^B) 为 Invitrogen 产品, DH5 为本室保藏菌种。

1.3 主要试剂

质粒提取试剂盒及胶回收试剂盒为 Omega 产品; Ex Taq 聚合酶、Kpn、EcoR、T₄ DNA 连接酶为 TaKaRa 产品; 三羟甲基氨基甲烷-碱盐 (Tris-base)、丙烯酰胺, 甲叉双丙烯酰胺为 Gibco-BRL 产品, 硝酸纤维素膜购自 PALL 公司, 蛋白质分子量标准和阿扑吗啡 (Apomorphine, APO) 为 Sigma 产品。M199 购自 GibcoBRL, Na¹²⁵I 为 Perkin Elmer (Boston, USA) 产品。HisTrap 试剂盒购自 Amersham Pharmacia, BCA 蛋白定量试剂盒为 Pierce 产品。

重组黑棘鲷 (*Acanthopagrus butcheri*) 生长激素及其抗血清为 GroPep 公司产品 (Australia)。重组鲤鱼 GH、重组金鱼催乳素由香港大学黄安林博士惠赠。HRP-羊抗兔抗体购于华美生物工程公司。

核苷酸序列的测定和寡核苷酸引物的合成委托上海生物工程公司, 正向引物 GHF: 5'-TCA TGG TAC CCA GCC AAT CAC AGA CGG CCA G-3'; 反向引物 GHR: 5'-GAC TGA ATT CCT ACA GGG TAC AGT TGG CCT C-3'。

1.4 基因的操作

PCR 扩增、DNA 片段的酶切、连接、转化和免疫印迹等参照 Sambrook *et al.* (1989), 质粒的提取、DNA 片段的回收参照试剂盒说明程序进行。

1.5 生长激素融合蛋白的表达及纯化

重组质粒转入 BL21 (DE3) 中, 挑取单菌落, 接种 Luria-Bertani 培养基, 37 °C 培养过夜, 按 1:50 转接 1 L LB 液体培养基, 振荡培养至菌液 OD₆₀₀ 为 0.6 时, 加入 1 mmol/L IPTG 诱导培养 6 h, 离心收集细菌, 悬浮于 10 mmol/L Tris ·Cl pH 7.5, 超声波破菌, 10 mmol/L Tris ·Cl pH 7.5 - 0.1% Triton X-100 洗涤包涵体, 4 °C, 12 000 r/min 离心 30 min, 收集包涵体, 用 0.1 mmol/L NaH₂PO₄-0.01 mmol/L Tris ·Cl pH 8.0 - 8 mol/L 尿素溶解包涵体, 在不含尿素的 0.1 mmol/L NaH₂PO₄-0.01 mmol/L Tris ·Cl pH 8.0 溶液中透析, 换液 3 次, 镍离子亲和层析柱纯化融合蛋白 (参照 HisTrap 试剂盒说明书), BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。于终浓度为 1 mmol/L 氧化型谷胱甘肽 - 9 mmol/L 还原型谷胱甘肽的 0.1 mmol/L NaH₂PO₄ - 0.01 mmol/L Tris ·Cl pH 8.0 溶液中复性, 冷冻干燥后 - 80 °C 保存。

1.6 重组生长激素特异性抗体的制备

100 μg 纯化的斜带石斑鱼重组生长激素 (Recombinant grouper growth hormone, rgGH) 与等量弗氏完全佐剂混匀, 皮下注射新西兰大耳兔, 每周免疫 1 次, 共进行 4 次免疫, 最后一次用 200 μg 的 rgGH 加强免疫, 2 周后颈动脉放血, 分离血清后, 用直接 ELISA 测定抗体效价, 具体操作如下: 10 μg/ml 纯化重组生长激素包被 96 孔酶联板 (Nunc, Denmark), 4 °C 包被过夜, 黑棘鲷生长激素 10 μg/ml 包被 3 孔为阳性对照, 1% BSA 溶液 37 °C 封闭 2 h, 每孔加入 100 μl 倍比稀释的抗血清, 37 °C 0.5 h, 加入 100 μl HRP-羊抗兔抗体 (1:1 000), 37 °C 反应 0.5 h, OPD 底物显色测定 OD₄₉₀。

1.7 斜带石斑鱼 GH RIA 的建立和 GH 的测定

乳脱氢过氧化物酶法 (Yamamoto *et al.*, 2000) 标记 rgGH 作为示踪物, 兔抗 rgGH 抗体应用浓度为 1:160 000, 生长激素的放射免疫测定参照 Cook *et al.* (1983) 等方法; 将 rgGH 系列稀释 (0.625 ~ 800 ng/ml, *n* = 6), 黑棘鲷生长激素系列稀释 (2.5 ~ 25 ng/ml, *n* = 6), 重组鲤鱼 GH 和金鱼催乳素分别稀释 100、200 和 400 ng/ml (*n* = 6), 样品孵育液为 2、4、8 和 16 倍稀释 (*n* = 5), 测定 RIA 的灵敏度、重复性和特异性。孵育液样品以双平行管测定, 测定结果表示为对照组的百分比, 数据分析采用 SPSS 统计分析软件 Fisher's

least-significant difference test (LSD) 法进行多重比较, 当 *P* < 0.05 时认为差异显著, *P* < 0.01 时认为差异极显著。数据记为平均值 ± 标准误。

1.8 斜带石斑鱼脑垂体碎片的静态孵育

参照虹鳟脑垂体碎片的静态孵育方法 (Yada *et al.*, 1991), 实验鱼断头处死, 立即取出垂体置于冰浴的 Hank's 培养液中清洗 3 次, 将脑垂体切成小于 1 mm³ 的碎片。清洗碎片多次后, 将每份相当于 1/3 个脑垂体的碎片转移到 24 孔细胞培养板中静态孵育, 孵育温度 25 °C, 5% CO₂, 饱和湿度。预孵育 16 ~ 24 h 后, 进行 APO 的刺激实验。APO 的时间梯度实验分为 4 组, 每组分为对照和处理两个小组, 分别设置 3 次重复, 处理组加入终浓度为 10⁻⁶ mol/L 的 APO, 对照组加入 1 μl M199 培养液, 分别于作用 2、6、12、24 h 后收集孵育液, 冻存于 - 20 °C 待测 GH; APO 的浓度梯度实验分为 4 组, 第一组为对照组, 第二组至第四组为处理组, 对照和处理各重复 3 次, 对照组加入 1 μl M199 培养液, 第二组至第四组分别加入终浓度为 10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶ mol/L 的 APO, 作用 12 h 后收集孵育液, 冻存于 - 20 °C 待测。

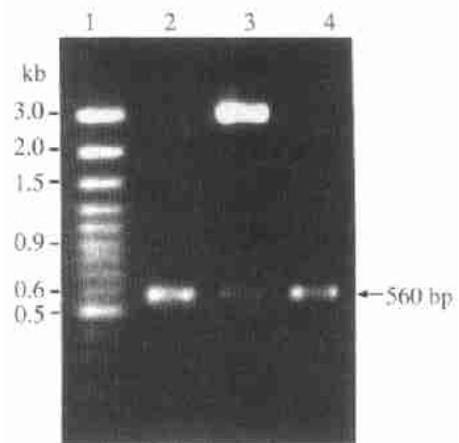


图 1 重组质粒的分析

Fig. 1 Analysis of the recombinant plasmid containing the GH gene of the orange-spotted grouper

1: DNA 分子量标准 (DNA marker) 2: 斜带石斑鱼 GH cDNA 扩增产物 (The amplified fragments of grouper GH cDNA)
3: 质粒 pRGH6 的 *Kpn*I、*Eco*R 双酶切产物 (pRGH6/ *Kpn*I and *Eco*R) 4: 重组子 pRGH6-BL21 的扩增产物 (PCR products of pRGH6-BL21)

2 结果

2.1 斜带石斑鱼生长激素基因表达质粒的构建

以质粒 pGH5 为模板, 用引物 GHF 和 GHR 通

过 PCR 扩增 GH 基因 560 bp DNA 片段，经 *Kpn*、*EcoR* 双酶解后，与表达载体 pRSET 连接，转化大肠杆菌 BL21 (DE3)，随机挑取 20 个转化子，用引物 GHF 和 GHR 进行 PCR 检测，阳性克隆再用 *Kpn* 和 *EcoR* 双酶切，电泳分析，证实重组质粒含有 560 bp 的插入片段 (图 1)；双脱氧末端终止法测定其中 4 个重组质粒的插入片段 DNA 序列，证实读码框和核苷酸序列正确。将其中一个重组质粒命名为 pRGH6。

2.2 斜带石斑鱼生长激素融合蛋白的表达及纯化

重组质粒 pRGH6 转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 后，诱导物用 15% SDS-PAGE 凝胶电泳分析 (图 2)，在 26 kD 处出现一条表达蛋白带，同时分离的包涵体蛋白及亲和层析柱纯化产物均有 26 kD 蛋白带，用黑棘鲷 GH 抗体经 Western 免疫印迹分析，证实此带为生长激素蛋白。凝胶扫描分析 rgGH 表达量占细菌总蛋白量的 43%，产率为 128 mg/L 培养液，表达产物经镍离子亲和层析柱纯化后获得一条蛋白带，表明纯化蛋白达到电泳纯。

2.3 特异性抗血清的制备

以纯化的 rgGH 为抗原免疫家兔，每次注射抗原前抽取 1 ml 血液，直接 ELISA 测定效价，各次效价测定结果见表 1。抗血清效价随免疫时间的延长逐渐上升，经四次免疫后，获得斜带石斑鱼重组生长激素的高效价抗血清。

2.4 斜带石斑鱼重组生长激素放射免疫测定法的

建立

以纯化的 rgGH 为标准蛋白，¹²⁵I 标记后作为示踪物，特异性抗体为第一抗体，羊抗兔抗体作为第二抗体，建立 rgGH 的双抗体竞争性 RIA (图 3)。该系统的灵敏度为 15.625 pg (n = 6)，组内变异系数为 4.24% (n = 5)，组间变异系数为 8.07% (n = 5)，脑垂体孵育液和黑棘鲷 GH 的系列稀释曲线与标准曲线平行，金鱼催乳素、重组鲤鱼 GH 与标准曲线不平行。

表 1 不同免疫时期斜带石斑鱼重组生长激素的抗血清效价

Table 1 Titers of antiserum against the recombinant grouper GH in different immunity stages

免疫过程 Immune procedures	距第一次免疫的时间 Days from the first immunity	效价 Titers
第一次免疫 (The first immunity)	10	1 64
第二次免疫 (The second immunity)	17	1 8 000
第三次免疫 (The third immunity)	24	1 64 000
第四次免疫 (The fourth immunity)	34	1 80 000

2.5 APO对斜带石斑鱼脑垂体碎片GH释放的影响

应用重组斜带石斑鱼 GH RIA 分析了 APO 作用不同时间对斜带石斑鱼脑垂体碎片 GH 释放的影

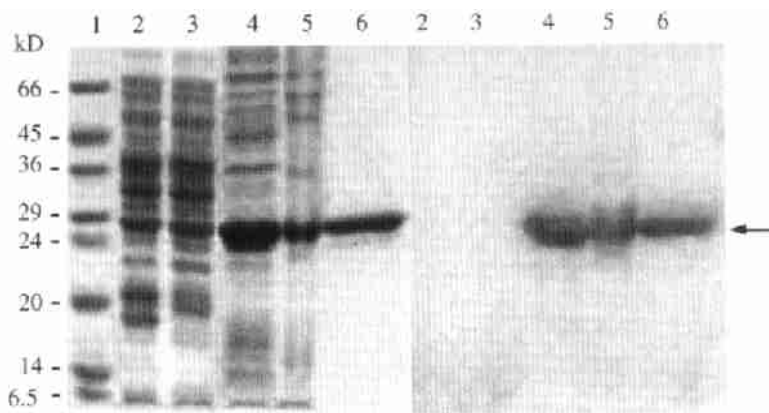


图 2 重组斜带石斑鱼生长激素的 SDS-PAGE 及免疫印迹分析

Fig. 2 SDS-PAGE of recombinant GH of the orange-spotted grouper and Western blot

1: 蛋白质分子量标准 (The molecular weight of protein marker) 2: BL21 全细胞裂解物 (Total lysate of BL21) 3: BL21/pRGH6 全细胞裂解物 (未诱导) (Total lysate of pRGH6-BL21 uninduced) 4: BL21/pRGH6 全细胞裂解物 (1 mmol/L IPTG 诱导 6 h) (Total lysate of pRGH6-BL21 induced by 1 mmol/L IPTG for 6 h) 5: 包涵体蛋白 (Proteins of the soluble inclusion body) 6: 镍离子亲和柱纯化的 GH 融合蛋白 (The GH fusion protein purified by Ni²⁺-chelating column) 左图 (Left): SDS-PAGE 右图 (Right): 免疫印迹 (Data of Western blot)

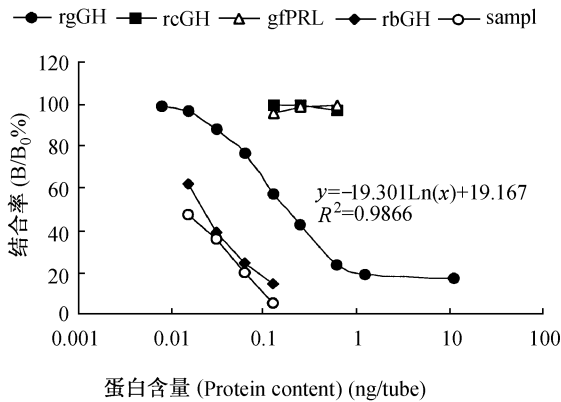


图3 rgGH、重组鲤鱼GH、金鱼催乳素、重组黑棘鲷GH及孵育液样品与抗rgGH抗体的竞争性结合曲线

Fig. 3 The displacement of ^{125}I labeled rgGH by the unlabeled rgGH ($n = 6$), recombinant carp GH (rcGH) ($n = 6$), goldfish prolactin (gfPRL) ($n = 6$), recombinant black bream GH (rbGH) ($n = 6$) and incubation sample at various concentrations ($n = 5$)

响(图4)。 10^{-6} mol/L的APO作用2 h、6 h使垂体GH释放量增加,但与对照相比差异不显著($P > 0.05$),作用12 h、24 h后垂体GH的释放量明显高于对照组($P < 0.05$),分别为 381.05 ± 33.6 ng/ml和 526.09 ± 9.97 ng/ml ($n = 3$),作用12和24 h时的对照组分别为 212.41 ± 20.5 ng/ml和 310.03 ± 52.37 ng/ml ($n = 3$),12和24 h之间的GH释放量差异极显著($P < 0.01$)。

根据APO的时间梯度实验结果,选择孵育时间为12 h进一步研究不同剂量的APO对斜带石斑鱼脑垂体碎片GH释放的影响(图5), 10^{-8} mol/L APO作用垂体时所引起的GH释放量与对照组之间差异不显著(LSD检测, $P > 0.05$), 10^{-7} , 10^{-6} mol/L APO促进垂体释放的GH量明显高于对照组,并且 10^{-6} mol/L APO的效应明显高于 10^{-7} APO的效应(LSD法检测, $P < 0.05$), 10^{-7} 和 10^{-6} mol/L APO处理组GH含量分别为 232.78 ± 14.11 ng/ml和 324.15 ± 79.2 ng/ml ($n = 3$),对照组为 149.72 ± 5.84 ng/ml ($n = 3$)。

3 讨论

重组质粒pRGH6在大肠杆菌BL21中高效表达斜带石斑鱼重组生长激素,电泳分析其分子量为26 kD,经Western免疫印迹分析,证实此带含生长激素蛋白。为了在大肠杆菌中稳定表达重组斜带

石斑鱼生长激素,将斜带石斑鱼生长激素成熟肽DNA片段与载体pRSET上的原核基因融合,表达产物由N-端来自原核生物的41个氨基酸多肽部分和斜带石斑鱼GH成熟肽187个氨基酸残基组成,表达蛋白带的分子量与融合蛋白的计算分子量相符。融合蛋白中含有的六个组氨酸残基,可特异性地与 Ni^{2+} 螯合的亲合层析柱结合,GH重组蛋白得以纯化,经SDS-PAGE检测,纯化蛋白为单一的一条带,表明纯化的GH重组蛋白达到电泳纯,可以作为制备抗血清及免疫反应的抗原。

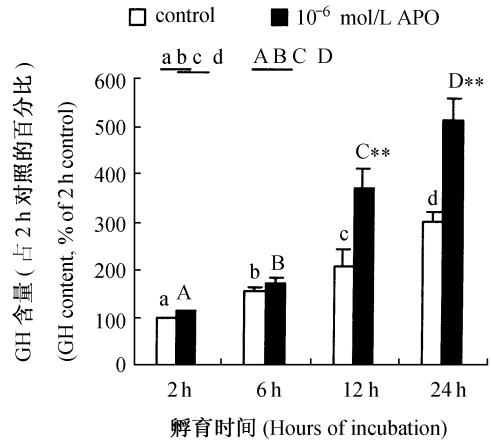


图4 APO作用不同时间对斜带石斑鱼脑垂体GH释放的影响

Fig. 4 Effects of APO on the GH release from pituitary fragments of orange-spotted grouper at different incubation duration

下划线字母表示其间差异不显著,所有数据表示为平均值 \pm 标准误($n = 3$),**表示差异极显著,小写字母a、b、c、d代表对照组,大写字母A、B、C、D代表APO处理组[The letters with the same underline indicate no significant differences ($P > 0.05$, LSD). All data were expressed as mean \pm SE ($n = 3$). ** $P < 0.01$, LSD test. a, b, c, d represented the control group; A, B, C, D represented the experimental groups with APO]

以纯化的rgGH和特异性抗体建立了斜带石斑鱼GH RIA,测定了脑垂体孵育液、黑棘鲷GH、金鱼催乳素、重组鲤鱼生长激素的系列稀释梯度与rgGH的竞争性取代曲线,结果表明建立的RIA可用于斜带石斑鱼脑垂体孵育液的测定,金鱼催乳素、重组鲤鱼生长激素与rgGH之间没有交叉反应,斜带石斑鱼GH RIA具有良好的特异性和重复性;该系统的灵敏度为15.625 pg,略高于金头鲷重组GH RIA的灵敏度(30 pg)(Barbera *et al.*, 1995)。

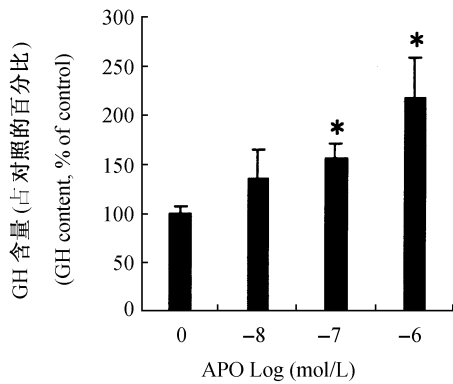


图5 不同浓度的APO对斜带石斑鱼脑垂体GH释放的影响

Fig. 5 Effects of APO at different concentrations on the GH release from pituitary fragments of orange-spotted grouper at 12-hr incubation

10^{-8} mol/L APO 引起的 GH 释放量差异不显著 ($P > 0.05$), 10^{-7} 和 10^{-6} mol/L APO 引起的 GH 释放量差异极显著 ($* P < 0.05$), 所有数据表示为平均值 \pm 标准误 ($n = 3$) [Compared with the control, GH response to 10^{-8} mol/L APO were not significant ($P > 0.05$), and 10^{-7} and 10^{-6} mol/L APO stimulated GH release were significant ($* P < 0.05$). LSD test. All data were expressed as Mean \pm SE ($n = 3$)]

金鱼生长激素基因在大肠杆菌中表达出的融合蛋白中含有 14 个氨基酸残基, 这种重组金鱼生长激素不仅可以用于 GH 含量的测定, 同样能促进金鱼的生长 (Mahmoud *et al.*, 1998)。本研究也表明, 在大肠杆菌中表达的重组斜带石斑鱼生长激素纯化后可以保持其抗原性, 融合的原核部分的存在不影响生长激素蛋白的免疫原性, 为蛋白类激素制品的制备提供了一条可行的途径。

应用重组斜带石斑鱼 GH RIA 研究了 APO 作用不同时间对斜带石斑鱼脑垂体碎片 GH 释放的影响, 表明 APO 作用 12 ~ 24 h 后对离体孵育斜带石斑鱼脑垂体碎片 GH 的释放有时间依存性 (图 4)。斜带石斑鱼垂体对 APO 的应答与金鱼相比明显偏低, 10^{-6} mol/L APO 作用 2 h 能以剂量方式促进分离的金鱼垂体细胞释放 GH (Chang *et al.*, 1990), 这可能与分离的垂体细胞比垂体组织碎片能较快地产生反应有关。

不同剂量 APO 对斜带石斑鱼脑垂体碎片的作用结果显示, APO 以剂量依存方式促进斜带石斑鱼脑垂体碎片释放 GH (图 5)。斜带石斑鱼脑垂体对 APO 的应答与金鱼 (Chang *et al.*, 1990)、鲤

鱼 (Lin *et al.*, 1993) 和罗非鱼 (Melamed *et al.*, 1996) 等相一致。APO 为多巴胺受体 D_1 和 D_2 的激动剂, 能以剂量方式促进金鱼 (Chang *et al.*, 1990)、鲤鱼 (Lin *et al.*, 1993) 垂体释放 GH, 腹腔注射和口服均可促进金鱼 (Wong *et al.*, 1993) 和非洲鲈鱼 (Lescroart *et al.*, 1997) 血液 GH 水平上升, 促进金鱼和鲤鱼 (王黎等, 1997) 的生长。荧光免疫组化研究结果提示, 多巴胺 D_1 受体分布于垂体远侧部 GH 细胞富集处, 多巴胺能神经元与 GH 细胞表面形成突触 (Agustsson *et al.*, 2000), APO 与受体 D_1 结合后, 激活 cAMP/PKA 途径 (Chang *et al.*, 1994), 引起细胞内的 Ca^{2+} 水平增加 (Wong *et al.*, 1994), 促进 GH 的释放; 同时激活垂体特异性转录因子 Pit-1, 增加 GH mRNA 的转录, 促进 GH 的合成 (Lew *et al.*, 1995), 除此之外, APO 还通过抑制生长抑素的合成促进 GH 的释放 (Otto *et al.*, 1999)。本文研究结果首次证明多巴胺能物质参与石斑鱼属 GH 分泌的调控, 为石斑鱼属苗种生长发育的内分泌调控提供新的研究思路。

参考文献 (References)

- Agustsson, T., L. O. E. Ebbesson and B. T. Bjornsson 2000 Dopaminergic innervation of the rainbow trout pituitary and stimulatory effect of dopamine on growth hormone secretion *in vitro*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **127**: 355 ~ 364.
- Barbera, J. P. M., C. Pendon, H. M. Palanca, J. A. C. Gner, R. B. Rodriguez, M. M. Valdivia and J. P. Sanchez 1995 The use of recombinant gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone for radioiodination and standard preparation in radioimmunoassay. *Comparative Biochemical Physiology* **110A**: 335 ~ 340.
- Chang, J. P., K. L. Yu, A. O. L. Wong and R. E. Peter 1990 Differential actions of dopamine receptor subtypes on gonadotropin and growth hormone release *in vitro* in goldfish. *Neuroendocrinology* **51**: 664 ~ 674.
- Chang, J. P., F. V. Goor, A. O. L. Wang, R. M. Jobin and C. M. Neumann 1994 Signal transduction pathways in GnRH and dopamine D_1 -stimulated growth hormone secretion in the goldfish. *Chinese Journal of Physiology* **37**: 111 ~ 127.
- Chen, S. L., W. T. Deng, X. T. Liu, X. H. Chen and H. Long 1995 Isolation and purification of growth hormone from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and its preparation of antibody against the gcGH. *Acta Zoologica Sinica* **42** (3): 282 ~ 290. [陈松林, 邓文涛, 刘宪亭, 陈细华, 龙华 1995 草鱼垂体生长激素分离纯化及其抗体制备的研究. *动物学报* **42** (3): 282 ~ 290.]

- Cook, A. F., S. W. Wilson and R. E. Peter 1983 Development and validation of a carp growth hormone radioimmunoassay. *General Comparative Endocrinology* **50**: 335 ~ 347.
- Farmer, S. W., H. Papkoff, T. Hayashida, T. A. Bewley, H. A. Bern and C. H. Li 1976 Purification and properties of teleost growth hormone. *General and Comparative Endocrinology* **30**: 91 ~ 100.
- Jackson, L. F., P. Swanson, C. Duan, S. Fruchtman and C. V. Sullivan 2000 Purification, characterization, and bioassay of prolactin and growth hormone from temperate basses, genus *Morone*. *General and Comparative Endocrinology* **117**: 138 ~ 152.
- Lescroart, O., I. Roelants, T. Mikolajczyk, P. T. Bosma, R. W. Schulz, E. R. Kuhn and F. Ollevier 1996 A radioimmunoassay for African catfish growth hormone: validation and effects of substances modulating the release of growth hormone. *General and Comparative Endocrinology* **104**: 1 095 ~ 6 840.
- Lescroart, O., I. Roelants, N. Cauwenberghs, R. D. Schrijver, E. R. Kuhn and F. Ollevier 1997 Effect of route and frequency of administration of apomorphine on growth hormone release in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Life Sciences* **60**: 1 771 ~ 1 779.
- Lew, A. M. and H. P. Elsholtz 1995 A dopamine-responsive domain in the N-terminal sequence of Pit-1. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 7 156 ~ 7 160.
- Lin, H. R., Q. Zhang and R. E. Peter 1995 Effects of recombinant tuna growth hormone (GH) and analogs of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) on growth of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture* **129**: 341 ~ 343.
- Lin, H. R. 1996 The regulation of growth and growth hormone secretion in fish. *Acta Zoologica Sinica* **42** (1): 69 ~ 79. [林浩然 1996 鱼类生长和生长激素分泌活动的调节. *动物学报* **42** (1): 69 ~ 79.]
- Lin, X. W., H. R. Lin and R. E. Peter 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. *General and Comparative Endocrinology* **89**: 62 ~ 71.
- Mahmoud, S. S., S. Wang, M. M. Moloney and H. R. Habibi 1998 Production of a biologically active novel goldfish growth hormone in *Escherichia coli*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **120**: 657 ~ 663.
- Melamed, P., N. Eliahu, B. L. Sivan, M. Ofir, O. F. Pisanty, F. R. Delrue, J. Smal, Z. Yaron and Z. Naor 1995 Hypothalamic and thyroidal regulation of growth hormone in tilapia. *General and Comparative Endocrinology* **97**: 13 ~ 30.
- Melamed, P., G. Gur, A. Elizur, H. Rosenfeld, B. Sivan, F. R. Delrue and Z. Yaron 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, tilapia. *Neuroendocrinology* **64**: 320 ~ 328.
- Otto, C. J., X. W. Lin and R. E. Peter 1999 Dopaminergic regulation of three somatostatin mRNAs in goldfish brain. *Regulatory Peptides* **83**: 97 ~ 104.
- Sakamoto, T., B. S. Shepherd, S. S. Madsen, R. S. Nishioaka, K. Siharath, N. H. Richman, H. A. Bern and E. G. Grau 1997 Osmoregulatory actions of growth hormone and prolactin in an advanced teleost. *General and Comparative Endocrinology* **106**: 95 ~ 101.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis 1989 Molecular Cloning: a laboratory Manual. 2ed edn. New York: Cold Spring Harbor Lab Press.
- Sekine, S., T. Mizukami, T. Nishi, Y. Kuwana, A. Saito, M. Sato, S. Itoh and H. Kawauchi 1985 Cloning and expression of salmon growth hormone in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 4 306 ~ 4 310.
- Wang, L., H. R. Lin and W. M. Zhang 1997 Hormone secretion in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* **36** (1): 119 ~ 121. [王黎, 林浩然, 张为民 1997 阿扑吗啡对 LHRH-A 促进鲤鱼 GH 和 GH 分泌的影响. *中山大学学报* **36** (1): 119 ~ 121.]
- Wong, A. O. L., J. P. Chang and R. E. Peter 1993 *In vitro* and *in vivo* evidence that dopamine exerts growth hormone-releasing activity in goldfish. *American Journal of Physiology* **64**: E925 ~ E932.
- Wong, A. O. L., F. V. Goor and J. P. Chang 1994 Entry of extracellular calcium mediates dopamine D1-stimulated growth hormone release from goldfish pituitary cells. *General and Comparative Endocrinology* **94**: 316 ~ 328.
- Xu, B., P. J. Zhang, H. Z. Miao, D. S. Li, S. Moriyama and H. Kawauchi, 1998 Isolation and bioactivity of growth hormone from Japanese seabass, *Lateoabralabrax japonicus*. *Acta Zoologica Sinica* **44** (2): 170 ~ 178. [徐斌, 张培军, 苗宏志, 李德尚, 森山俊介, 川内浩司 1998 鲈鱼生长激素的分离及其生物活性鉴定 *动物学报* **44** (2): 170 ~ 178.]
- Yada, T., A. Urano and T. Hirano 1991 Growth hormone and prolactin gene expression and release in the pituitary of rainbow trout in serum-free culture. *Endocrinology* **129**: 1 183 ~ 1 192.
- Yamamoto, K., N. Takahashi, T. Nakai, S. Miura, A. Shioda, T. Iwata, T. Kouki, T. Kobayashi and S. Kikuyama 2000 Production of a recombinant new growth hormone and its application for the development of a radioimmunoassay. *General and Comparative Endocrinology* **117**: 103 ~ 116.