生殖季节文昌鱼阿片肽的研究

沈卫斌 殷 红 王 红 张崇理

(中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放实验室, 青岛 266071;
中国科学院动物研究所内分泌室, 北京 100080)

关键词 阿片肽、生殖

在高等哺乳动物中, 阿片肽 (尤其是 β -End) 在下丘脑促黄体素释放素 (luteinizing hormone-releasing hormone, LHRH) 分泌的调节中具有重要的作用。在进化上处于重要地位的脊索动物——文昌鱼中, 是否也有与高等动物类似的情况值得研究。张致一等在文昌鱼哈氏窝 (Hatschek's pit) 上皮细胞中观察到阳性促黄体素 (luteinizing hormone, LH)、促滤泡素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 和 LHRH 免疫反应颗粒^[1]; 张崇理等在文昌鱼中初步观察到有两种 LHRH, 即哺乳动物 LHRH 和鲑鱼 LHRH^[2,3]。通过免疫组织化学法, 我们实验室最近又在文昌鱼性腺和脊索中观察到 β -End 的阳性反应。本工作采用生物化学分离和鉴定技术以及放射免疫分析, 证明了文昌鱼中有阿片肽的存在并与生殖活动有关。

一、材料和方法

1. 材料 文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri* var. *Tsingtaonesis*) 于每年 6—7 月 (生殖季节) 取自青岛海滨, 长度 3—5 cm。根据性腺的外部特征区分出雌雄鱼。

2. 组织中阿片肽的分离和纯化 文昌鱼雌雄不拘 (液氮保存备用), 实验前剪碎鱼体, 加入 0.1 mol/L HCl ($W:V = 1:10$), 用高速匀浆器制成匀浆, 离心去沉淀, 上清液用 1.0 mol/L NaOH 调 pH 至 5.0, 高速离心 (30000 g, 30 min) 去沉淀, 上清液脱脂, 真空干燥。干燥后的粗提物经制备型高压液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分离并用 β -End 放射免疫分析进行检测。

3. HPLC 定性分析 收集含阿片肽的制备型 HPLC 洗脱液, 浓缩后注入 HPLC 做定性分析。其收集液抽干后做放射免疫分析。

4. 生殖季节文昌鱼体内 β -End 的测定 在人工养殖条件下, 生殖期文昌鱼于 6 月底至 7 月初的每日傍晚排卵或排精。捞取游到水面排卵或排精的文昌鱼, 饲养一定时间 (2—12、24、48、72 h) 后, 将其剪成数段, 置于 2 mol/L 醋酸中煮沸 10 min, 冷却后用微型超声波匀浆器匀浆, 离心, 上清液冰冻干燥后待测。

5. 放射免疫分析 (radioimmunoassay, RIA) β -End 采用祝元祥等建立的方法^[4]进行测定。

二、实验结果

1. 阿片肽的分离和纯化 文昌鱼的酸提取物, 经制备 HPLC 分离洗脱, 在第九、十收集

本文 1990 年 3 月 19 日收到。1990 年 6 月 29 日收到修改稿。

管测到了 β -End 活性(图 1)。该部分收集液经浓缩后注入 HPLC 做定性分析。

图 1 文昌鱼粗提物经制备 HPLC 分离的色谱图

收集液用 β -End(■)放射免疫分析进行测定。——吸光度。溶剂系统: 从 A 到 B 做线性梯度洗脱 (40 min)。A. 0.1% 三氟乙酸; B. 80% 甲醇/0.1% 三氟乙酸(-----)流速: 5ml/min

量显著降低(排前与排后 2—12h 之间有明显差异, $p < 0.05$), 此后逐渐回升, 至 72h 恢复到排前水平(图 4)。

2. HPLC 定性分析

根据标准品和样品中峰的保留时间, 以及 RIA 测定结果, 我们观察到文昌鱼中有 β -End、Dyn A 和 Leu-Enk 三种阿片肽(图 2、图 3)。在我们的色谱条件下, Met-Enk 和 Neo-End 具有非常相近的保留时间, 在色谱图中不能区分(图 2)。

3. 生殖季节文昌鱼体内 β -End 的变化

雌、雄文昌鱼在排卵(雌性)或排精(雄性)前后体内 β -End 具有相同的变化趋势, 即在排卵或排精后的 2—12h, 其体内 β -End 含

图 2 标准阿片肽的反向 HPLC 色谱图

标准阿片肽包括: β -End、Dyn A、Leu-Enk、Met-Enk 和 Neo-End。柱子尺寸: ODS 柱, 0.46×25 cm。——吸光度, ----溶剂 B(%), 溶剂系统: 从 A 到 B 做线性梯度洗脱 (70min)。

A. 50mmol/L KH_2PO_4 - H_3PO_4 (pH 2.0):

$\text{CH}_3\text{CN} = 90:10$;

B. 50 mmol/L KH_2PO_4 - H_3PO_4 (pH 2.0):

$\text{CH}_3\text{CN} = 50:50$ 。

流速: 0.6ml/min

图 3 文昌鱼提取物经梯度 HPLC 分离的色谱图

色谱条件与图 2 相同。收集液采用 β -End 放射免疫分析进行检测(□)。箭头所指为以下阿片肽的峰: β -End、Dyn A、Leu-Enk、Met-Enk 和 Neo-End。——吸光度, ----溶剂 B(%)

三、讨 论

通过生物化学分离纯化和鉴定, 我们证实了在文昌鱼中有 β -End、Dyn A 和 Leu-Enk 三种阿片肽。在本实验的色谱条件下, 因 Met-Enk 和 Neo-End 具有相似的保留时间而不能区分(图 2), 因此, 在文昌鱼中是否存在 Met-Enk 和 Neo-End, 有待改进色谱条件和采用 RIA 作进一步的鉴定。

图4 文昌鱼在排卵(雌性)和排精(雄性)前后体内 β -End 含量的变化

* 排前与排后 2—12h 间有显著差异, $p < 0.05$

在哺乳动物中的大量工作表明,阿片肽在生殖中具有重要的作用,其中 β -End 与下丘脑 LHRH 分泌之间有密切的关系^[5, 6]。下丘脑 LHRH 通过改变垂体 LH/FSH 的释放从而调节性激素水平和生殖功能,而性激素则可通过 β -End 对下丘脑 LHRH 分泌产生反馈调节作用^[5, 7]。据报道,外源性阿片样物质吗啡对动物的排卵有抑制作用^[8]。脊索动物文昌鱼,具有许多脊椎动物祖先的特征,在进化上处于非常重要的地位。已有许多工作表明,文昌鱼体内存在多种与生殖有关的激素^[1-3]。本工作首次证实文昌鱼体内有 β -End、Dyn A 和 Leu-Enk 三种阿片肽的存在,并观察到 β -End 与文昌鱼的排卵(雌性)和排精(雄性)有关(图 4)。此时,其体内 β -End 含量明显降低 ($p < 0.05$)。这一结果或可说明由于 β -End 水平的下降,解除了对 LHRH 样物质的抑制作用,因而导致排卵或排精。

参 考 文 献

- [1] Zhang, C. Y. et al., in *Frontiers in Physiology Research* (Eds. Garlic, D. G. et al.), Australia, 1984, 79—86.
- [2] 张崇理、殷红、沈卫斌等,动物学报,34(1988),294.
- [3] 张崇理、殷红、沈卫斌等,生理通讯(增刊 3),1988,83.
- [4] 祝元祥、管小滨、崔瑞耀等,第二军医大学学报,7(1986),332—336.
- [5] Kalra, S. P., *J. Steroid Biochem.*, 23(5B) (1985), 733—742.
- [6] Millan, M. J. and Albert Herz, *International Review of Neuroendocrinology*, 26(1985), 1—83.
- [7] Cicero, T. J. et al., *Endocrinol.*, 104(1979), 1285—1291.
- [8] Packman, P. M. and Rothchild, J.A., *Endocrinol.*, 99(1976), 7—10.