

# 细胞外钙和钾离子对调节离体鲤脑 垂体促性腺激素分泌的影响\*

林信伟 李英文\*\* 林浩然

(中山大学生物系, 广州 510275)

**提 要** 作者于1990年9月—1991年1月采用离体灌流培育方法对鲤鱼脑垂体促性腺激素的分泌调节进行研究。结果表明,脑垂体基础促性腺激素(GtH)分泌不依赖于细胞外钙离子( $Ca^{2+}$ );但脉冲式鲑鱼促性腺激素释放激素(sGnRH)刺激的GtH分泌,则依赖于细胞外 $Ca^{2+}$ ,且细胞外 $Ca^{2+}$ 的作用至少部分通过电位敏感性 $Ca^{2+}$ 通道。50 mmol/L高浓度钾离子( $K^+$ )显著刺激脑垂体基础GtH分泌, $K^+$ 的作用是依赖于时间和细胞外 $Ca^{2+}$ 的;高浓度 $K^+$ 对脉冲式sGnRH刺激的GtH分泌没有显著影响。

**关键词** 鲑鱼 GnRH 促性腺激素 钙离子 钾离子 灌流 鲤鱼

硬骨鱼类同哺乳动物一样,脑垂体促性腺激素(GtH)的分泌同样受促性腺激素释放激素(GnRH)的刺激性调节(Peter et al., 1986)。研究证明,硬骨鱼类GnRH主要有鲑鱼GnRH(sGnRH)和鸡GnRH-II(cGnRH-II)两种(Sherwood, 1987),但对GnRH调节鱼类GtH分泌的受体后机理的研究不够。有关 $Ca^{2+}$ 在sGnRH或哺乳类GnRH(LHRH)类似物刺激GtH分泌中的作用,仅在金鱼(Chang et al., 1990)和印度月鳢(*Channa punctatus*) (Jamaluddin et al., 1989)中有一些报道,而 $K^+$ 的作用还未见报道。

本文的目的在于采用离体灌流培育方法,研究细胞外 $Ca^{2+}$ 对鲤鱼脑垂体基础GtH分泌和脉冲式sGnRH刺激鲤鱼脑垂体GtH分泌作用的影响,并检查细胞外 $K^+$ 对鲤鱼GtH分泌调节的影响及其与细胞外 $Ca^{2+}$ 的关系。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 于1990年9月—1991年1月在广州市农贸市场购得鲤鱼(*Cyprinus carpio* L.),其性腺正在发育(不分性别),成熟系数(性腺重/体重)为 $13.3 \pm 4.1\%$ ;体重在360—627g。实验前,在室温和自然光周期下暂养于室内水族箱内。

## 1.2 方法

**1.2.1 鲤鱼脑垂体碎片的离体灌流培育** 参照金鱼脑垂体碎片的离体灌流培育方法(Habibi et al., 1989)并稍加修改。鲤鱼断头后,取出脑垂体制成小于 $1\text{mm}^3$ 的碎片,将每份相当于半个脑垂体的碎片分别转移到0.3ml的灌流培育室中,并置于两层微载体cytodex(Sigma产品)之间。用199培养液(含Hanks盐溶液、25mmol/L

\* 高等学校博士点科学基金资助;加拿大国际发展研究中心资助,3-p-83-1101号,林信伟,男,出生于1965年2月。

收稿日期:1992年7月18日,接受日期:1992年10月30日。

\*\* 通讯联系人

HEPES 和 15IU/ml 制霉菌素)预灌流过夜(8—10h)。实验前 2h, 用 Hanks 盐溶液(含 25mmol/L HEPES 和 0.1% 牛血清白蛋白, 简称 HBSS) 或无钙的 HBSS 代替 199 培养液继续预灌流 2h。设 4 个灌流柱, 灌流温度为  $19 \pm 1^\circ\text{C}$ , 收集 5min 一管的样品, 贮于  $-28^\circ\text{C}$  待测。

**1.2.2 钙和钾离子对基础和脉冲式 sGnRH 刺激的 GtH 分泌的影响实验** 进行以下 4 项实验。

**实验一  $\text{Ca}^{2+}$  螯合剂的影响** 预灌流后, 4 个灌流柱的脑垂体碎片分别用正常的 HBSS、无钙 HBSS 以及含 500mmol/L 和 1.25mmol/L EGTA 的 HBSS 灌流 1h, 然后分别引入一个 2min 10nmol/L sGnRH 刺激, 再继续用上述灌流液灌流 1h。重复 4 次。无钙 HBSS 为缺  $\text{CaCl}_2$  的 HBSS, 另加 100 $\mu\text{mol/L}$  EGTA。

**实验二 不同浓度  $\text{Ca}^{2+}$  的影响** 用无钙 HBSS 预灌流 2h 后, 4 个灌流柱的脑垂体碎片分别用含 10.00mmol/L, 1.0mmol/L, 0.10mmol/L 和 0.01mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  的 HBSS 灌流 4h。从第二小时起, 间隔 1h 引入 3 个 2min 不同剂量(1nmol/L, 10nmol/L 和 100nmol/L) sGnRH 刺激。重复 4 次实验, 其中两次实验中 3 种剂量 sGnRH 以增加浓度顺序引入; 另两次以减少剂量顺序引入。含不同浓度  $\text{Ca}^{2+}$  的 HBSS 为缺  $\text{CaCl}_2$  的 HBSS, 分别加入不同浓度的  $\text{CaCl}_2$ 。

**实验三 电位敏感性  $\text{Ca}^{2+}$  通道 (VSCC) 阻滞剂戊脉安 (VER) 的影响** 预灌流后, 4 个灌流柱的脑垂体碎片分别用 HBSS, 以及含 0.1 $\mu\text{mol/L}$ , 1.0 $\mu\text{mol/L}$  和 10.0  $\mu\text{mol/L}$  VER 的 HBSS 灌流 3.5h。在灌流 0.5h 之后, 以 1h 间隔引入 3 个 2min 不同剂量 (1nmol/L 10nmol/L 和 100nmol/L) 的 sGnRH 刺激。重复 4 次实验。sGnRH 刺激引入方式同实验二。VER 用二甲亚砜配制, 并用 HBSS 稀释至所需浓度, 其中二甲亚砜含量不高于 0.1%。

**实验四 高浓度 (50mmol/L)  $\text{K}^+$  的影响** 预灌流后, 4 个灌流柱的脑垂体碎片分别用 HBSS (含 5.4mmol/L KCl), 高  $\text{K}^+$  HBSS, 高  $\text{K}^+$  无钙 HBSS 和无钙 HBSS 灌流 4h。在灌流 1h 之后, 以 1h 间隔引入 3 个 2min 不同剂量(1nmol/L, 10nmol/L 和 100nmol/L) 的 sGnRH 刺激。重复 4 次实验。sGnRH 引入方式同实验二。高  $\text{K}^+$  HBSS 为含 50mmol/L KCl 的 HBSS, 其中 NaCl 浓度随 KCl 浓度增加而相应减少; 高  $\text{K}^+$  无钙 HBSS 为缺  $\text{CaCl}_2$  的高  $\text{K}^+$  HBSS, 另加 100 $\mu\text{mol/L}$  EGTA。

4 个实验中 sGnRH (美国加州 Salk 研究所 Rivier 和 Vale 合成并赠送) 均用 HBSS 配成 10 $\mu\text{mol/L}$  贮存液, 实验时再分别用各自灌流柱的灌流液稀释至所需浓度。

**1.2.3 激素测定和数据统计分析方法** 样品中 GtH 含量的测定采用在本实验室建立的以鲤鱼成熟 GtH 为抗原和标准品的放射免疫测定法。脑垂体碎片对脉冲式 sGnRH 刺激的 GtH 分泌反应的计算参照 Habibi 等(1989)的方法。各实验的基础 GtH 水平是指第一个脉冲式 sGnRH 刺激引入前的刺激前平均基础分泌值, 并将此值转换为预灌流最后 30min (用 HBSS 或实验二中的无钙 HBSS) 的平均基础 GtH 分泌值的百分数。各组数据以平均值 $\pm$ 标准差表示。各刺激之间或各实验组之间的 GtH 分泌反应平均值或基础 GtH 分泌平均值之间的差异采用 Duncan 氏新复极差检验, 其显著水平为  $P < 0.05$  (实验结果插图中用不同字母表示)。

### 2 实验结果

**2.1  $Ca^{2+}$  螯合剂的影响** 用无钙 HBSS 或含不同浓度 EGTA 的 HBSS 灌流的鲤鱼, 其脑垂体碎片的基础 GtH 分泌值与正常 HBSS 灌流时的基础 GtH 分泌值之间无显著差异(图 1a); 但脑垂体碎片对 2min 脉冲式 10nmol/L sGnRH 刺激的 GtH 分泌反应显著低于正常 HBSS 灌流时的 GtH 分泌反应, 其中含 5mmol/L EGTA 的 HBSS 灌流时的 GtH 分泌反应又低于含 1.25mmol/L EGTA 或无钙 HBSS 灌流时的 GtH 分泌反应, 但三者之间无显著差异(图 1b)。

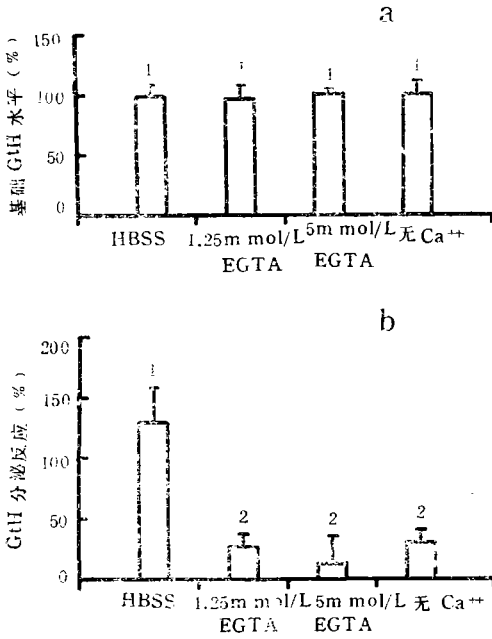


图 1  $Ca^{2+}$  螯合剂 EGTA 对鲤鱼脑垂体碎片基础的(a)和 10nmol/L sGnRH 刺激的 (b) GtH 分泌的影响(具相同数字组间无显著差异, 图 2、图 3、图 4 同)

Fig. 1 Effect of  $Ca^{2+}$  chelator EGTA on basal (a) and 10nmol/L sGnRH-stimulated (b) GtH secretion by perfused pituitary fragments of common carp (*Cyprinus carpio* L.) (Groups with common number are not significantly different, Fig. 2—Fig. 4 are same with Fig. 1)

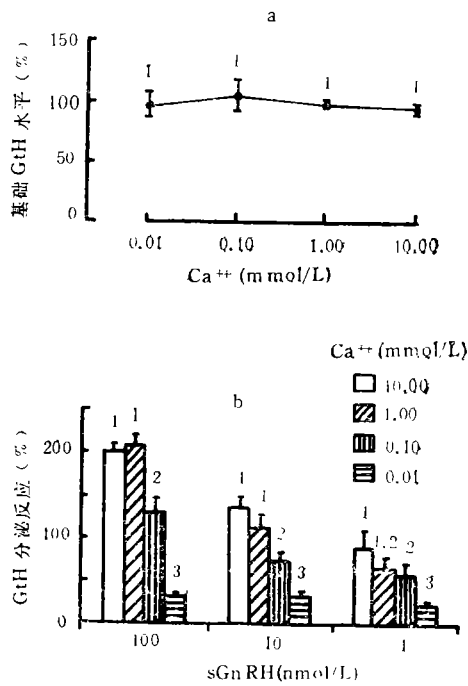


图 2 不同浓度细胞外  $Ca^{2+}$  对鲤鱼脑垂体碎片基础的 (a) 和 sGnRH 刺激的 (b) GtH 分泌的影响

Fig. 2 Effects of extracellular  $Ca^{2+}$  concentrations on basal (a) and sGnRH-stimulated (b) GtH secretion by perfused pituitary fragments of common carp (*Cyprinus carpio* L.)

**2.2 不同浓度  $Ca^{2+}$  的影响** 含不同浓度  $Ca^{2+}$  的 HBSS 灌流培育的鲤鱼脑垂体碎片的基础 GtH 分泌水平之间无显著差异, 且与无钙 HBSS 预灌流时的平均基础 GtH 水平之间也无显著差异 (图 2a)。在浓度为 0.01mmol/L, 0.10mmol/L, 和 1.00mmol/L 下,  $Ca^{2+}$  以剂量依存的形式促进 3 种剂量 sGnRH 刺激的 GtH 分泌; 但 10.00mmol/L  $Ca^{2+}$  并没有进一步促进 sGnRH 的作用, 在 10.00mmol/L 与 1mmol/L  $Ca^{2+}$  存在下, sGnRH 的作用之间无显著差异(图 2b)。在低浓度 (0.01mmol/L)  $Ca^{2+}$  存在下, 3 种剂

量 sGnRH 刺激的 GtH 分泌反应都很低, sGnRH 的作用没有明显的剂量依存关系(图 2b)。

**2.3 电位敏感性 Ca<sup>2+</sup> 通道 (VSCC) 阻滞剂戊脉安 (VER) 的影响** 用含 3 种剂量的 VER 灌注培育的鲤鱼脑垂体碎片的基础 GtH 水平, 与对照无显著差异 (图 3a)。VER 以剂量依存形式显著抑制 3 种剂量脉冲式 sGnRH 刺激的 GtH 分泌反应, 其中低剂量 (0.1μmol/L) VER 存在下, sGnRH 对 GtH 分泌的刺激作用与对照之间无显著差异(图 3b)。

**2.4 高浓度 K<sup>+</sup> (50mmol/L) 的影响** 用含 50mmol/L K<sup>+</sup> 的 HBSS 灌注培育的鲤鱼脑垂体碎片基础 GtH 分泌, 在灌注后 30min 内显著增加, 但 30min 后基础 GtH 水平恢复到正常 HBSS 灌注时的水平; 用高 K<sup>+</sup> 无钙 HBSS 灌注培育的鲤鱼脑垂体碎片的基础 GtH 分泌, 也在灌注后 30min 内显著增加, 但此值仍显著低于同时间单独高 K<sup>+</sup> 作用下的基础 GtH 水平, 30min 后, 基础 GtH 水平也恢复到正常 HBSS 灌注时的水平; 无钙 HBSS 对基础 GtH 水平无明显影响(图 4a)。

高 K<sup>+</sup> 对 3 种剂量脉冲式 sGnRH 刺激的 GtH 分泌没有显著影响, 仅对 10nmol/L sGnRH 的作用有显著促进作用; 高 K<sup>+</sup> 无钙的 HBSS 和无钙 HBSS 灌注培育的脑垂体

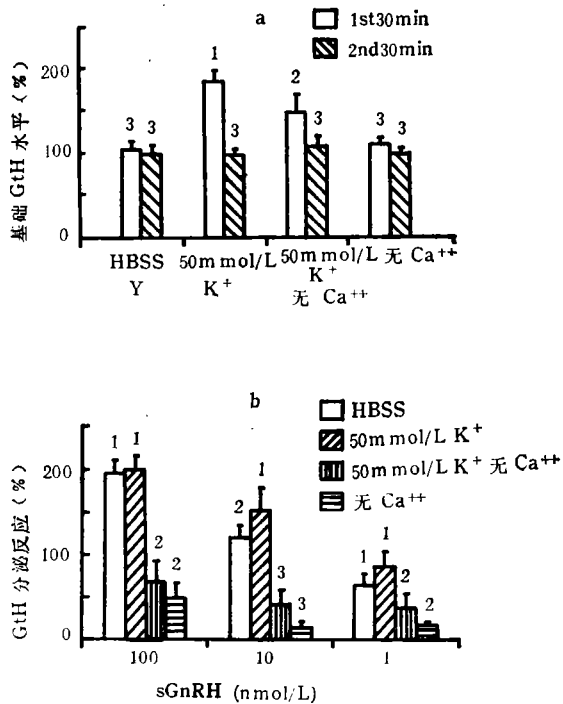
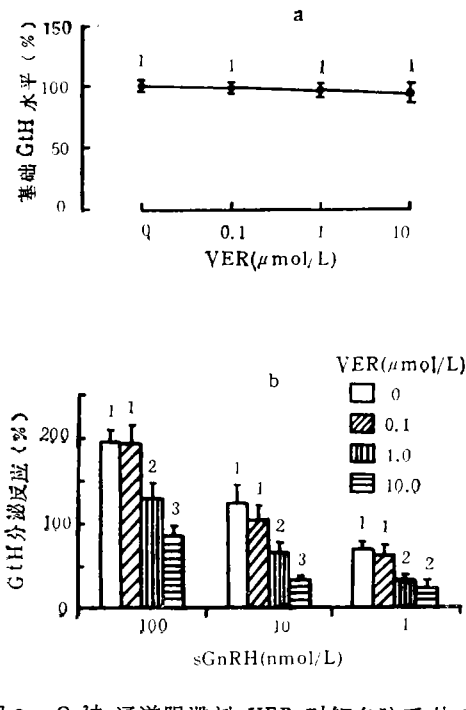


图 3 Ca<sup>2+</sup> 通道阻滞剂 VER 对鲤鱼脑垂体碎片基础的 (a) 和 sGnRH 刺激的 (b) GtH 分泌的影响

Fig. 3 Effects of voltage-sensitive Ca<sup>++</sup> channel antagonist verapamil (VER) on basal (a) and sGnRH-stimulated (b) GtH secretion by perfused pituitary fragments of common carp (*Cyprinus carpio* L.)

图 4 高浓度 K<sup>+</sup> (50mmol/L) 对脑垂脑垂体碎片基础的 (a) 和 sGnRH 刺激的 (b) GtH 分泌的影响

Fig. 4 Effects of elevated K<sup>+</sup> concentration (50mmol/L) on basal (a) and sGnRH-stimulated (b) GtH secretion by perfused pituitary fragments of common carp (*Cyprinus carpio* L.)

碎片对 sGnRH 刺激的 GtH 分泌反应相似, 且都显著低于对照和高  $K^+$  组; 用无钙 HBSS 或高  $K^+$  无钙 HBSS 灌流时, 3 种剂量 sGnRH 刺激 GtH 分泌反应的剂量依存关系不明显(图 4b)。

### 3 讨论与结语

**3.1** 鲤鱼离体脑垂体基础 GtH 分泌不依赖于细胞外  $Ca^{2+}$ ; 而 sGnRH 刺激的 GtH 的分泌则依赖于细胞外  $Ca^{2+}$ 。本实验证明, 无钙的 HBSS, 或用  $Ca^{2+}$  螯合剂 EGTA 消耗 HBSS 中的  $Ca^{2+}$ , 或用不同浓度的  $CaCl_2$  以改变灌流液的  $Ca^{2+}$  浓度, 或加入不同浓度  $Ca^{2+}$  通道阻滞剂阻断细胞外  $Ca^{2+}$  通过 VSCC 进入细胞内对灌流培育的鲤鱼脑垂体基础 GtH 分泌, 均没有影响。因此, 鲤鱼离体脑垂体基础 GtH 分泌不依赖于细胞外  $Ca^{2+}$ 。已证明, 哺乳类脑垂体基础促黄体生成素(LH)分泌不依赖于细胞外  $Ca^{2+}$ , 这可能是由于 GtH 分泌细胞上细胞外  $Ca^{2+}$  依赖的自动激活的 VSCC 数目较少, 因此其自动节律的电活动不能使细胞内  $Ca^{2+}$  浓度达到阈水平; 如果用  $Ca^{2+}$  通道激动剂延长自动激活的  $Ca^{2+}$  通道开放时间, 则可使细胞内  $Ca^{2+}$  浓度达到阈值, 引起基础 GtH 分泌的变化 (Stojilkovic et al., 1988)。在金鱼中,  $Ca^{2+}$  载体如 A23187 和 Ionomycin 也可主动增加细胞外  $Ca^{2+}$  内流, 从而影响基础 GtH 分泌 (Chang et al., 1990)。因此, 脑垂体 GtH 分泌细胞的电生理特性在哺乳类和鱼类之间可能是相似的。

在哺乳类, GnRH 刺激 GtH 分泌是一个高度依赖于  $Ca^{2+}$  的过程,  $Ca^{2+}$  参与 GtH 分泌细胞内第二信使系统, 调节 GnRH 受体后的信息转移和细胞内功能变化 (Clayton, 1989)。在本实验中, 无  $Ca^{2+}$  的 HBSS 或用 EGTA 消耗 HBSS 中的  $Ca^{2+}$  后, 都使 sGnRH 对灌流培育的鲤鱼脑垂体 GtH 分泌的刺激作用显著下降; 在 0.01—1.00mmol/L  $Ca^{2+}$  浓度范围, 随 HBSS 中  $Ca^{2+}$  浓度增加, sGnRH 促进 GtH 分泌作用显著增加。这些结果证明, sGnRH 刺激鲤鱼脑垂体离体 GtH 分泌作用, 依赖于细胞外  $Ca^{2+}$ 。在硬骨鱼类中, GnRH 刺激 GtH 分泌作用的  $Ca^{2+}$  依赖性, 还在金鱼 (Chang et al., 1990) 和印度月鳢 (Jamaluddin et al., 1989) 中发现。因此, 硬骨鱼类中 GnRH 的受体后作用机理可能与哺乳类相似。本结果还表明, 电位敏感性  $Ca^{2+}$  通道阻滞剂 VER 以剂量依存形式, 抑制 sGnRH 刺激的 GtH 分泌, 说明细胞外  $Ca^{2+}$  的作用至少部分是通过 VSCC 进入细胞, 促进细胞功能变化和 GtH 分泌, 这与哺乳类的研究结果也是一致的 (Chang et al., 1988)。在哺乳类, 高浓度(5mmol/L) EGTA 不仅可螯合细胞外  $Ca^{2+}$ , 而且可消耗细胞内  $Ca^{2+}$  贮存 (Chang et al., 1988)。本结果表明, 含 5mmol/L EGTA 的 HBSS 导致 sGnRH 刺激的 GtH 分泌反应下降的幅度最大, 说明 sGnRH 的作用机理也包括细胞内游离或贮存的  $Ca^{2+}$  的变化。

**3.2** 高浓度  $K^+$  显著刺激脑垂体基础 GtH 分泌, 且此作用是依赖于时间和细胞外  $Ca^{2+}$  的。在哺乳类, 高浓度  $K^+$  一般以剂量依存形式刺激脑垂体 GtH 分泌, 且高  $K^+$  的作用是细胞外  $Ca^{2+}$  依赖的 (Chang et al., 1988)。高  $K^+$  对鱼类脑垂体 GtH 分泌的影响在鱼类中尚未见有报道。在本实验中, 50mmol/L  $K^+$  显著刺激灌流培育的鲤鱼脑垂体基础 GtH 分泌, 并且其作用是时间和细胞外  $Ca^{2+}$  依赖的, 长时间的高  $K^+$  处理会导致 GtH 分泌的脱敏。高  $K^+$  对 GtH 分泌的促进作用的机理, 一般认为是高  $K^+$  促进胞膜去极化, 激活 VSCC, 增加细胞质  $Ca^{2+}$  浓度, 引起激素分泌反应 (Chang et al.,

1988), 但高  $K^+$  促进的长时间的膜去极化可使  $Ca^{2+}$  通道失活, 从而使 LH 分泌在短时间的分泌峰后迅速下降 (Stojilkovic et al., 1989)。本实验中, 在无细胞外  $Ca^{2+}$  存在下, 高  $K^+$  仍能在短时间内显著刺激 GtH 分泌增加, 这在哺乳类中也有发现 (Chang et al., 1988), 表明  $K^+$  的作用还通过其它不依赖于细胞外  $Ca^{2+}$  的途径刺激 GtH 分泌的机制。

在脊椎动物中, 有关高  $K^+$  对 GnRH 刺激 GtH 分泌作用影响的报道甚少。Kao 等(1977) 曾发现 10min 高  $K^+$  (12.2mmol/L) 处理可显著促进 GnRH 刺激的 GtH 分泌。本结果表明, 高  $K^+$  对 sGnRH 刺激 GtH 分泌作用没有明显影响。这可能是由于持续性的高  $K^+$  处理, 导致 GtH 细胞对进一步的高  $K^+$  刺激产生脱敏反应的结果。在无细胞外  $Ca^{2+}$  存在下, 不管是否存在高  $K^+$ , sGnRH 刺激的 GtH 分泌反应都显著下降, 这进一步证明 sGnRH 刺激鲤鱼 GtH 分泌依赖于细胞外  $Ca^{2+}$ 。

### 参 考 文 献

- Chang, J. P., Stojilkovic, S. S., Graeter, J. S., et al., 1988, Gonadotropin-releasing hormone stimulates luteinizing hormone secretion by extracellular calcium-dependent and-independent mechanisms, *Endocrinology*, **123**: 87—97.
- Chang, J. P., Freedman, G. L. and De Leeuw, R., 1990, Use of a pituitary cell dispersion method and primary culture system for the studies of gonadotropin-releasing hormone action in the goldfish, *Carassius auratus* II. Extracellular calcium dependence and dopaminergic inhibition of gonadotropin responses, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **77**: 274—282.
- Clayton, R. N., 1989, Gonadotropin-releasing hormone: its actions and receptors, *J. Endocrinol.*, **120**: 11—19.
- Habibi, H. R., Marchant, T. A., Nahorniuk, C. S., et al., 1989, Functional relationship between receptor binding and biological activity for analogs of mammalian and salmon gonadotropin-releasing hormones in the pituitary of goldfish (*Carassius auratus*), *Biol. Reprod.*, **40**: 1152—1161.
- Jamaluddin, M. D., Banerjee, P. P., Manna, R. P., et al., 1989, Requirement of extracellular calcium in fish pituitary gonadotropin release by gonadotropin-releasing hormone, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **74**: 190—198.
- Kao, L. W. L., Gunsalus, G. L., Williams, G. H., et al., 1977, Response of the perfused anterior pituitaries of rats to synthetic gonadotropin releasing hormone: a comparison with hypothalamic extract and demonstration of a role for potassium in the release of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone, *Endocrinology*, **101**: 1444—1454.
- Peter, R. E., Chang, J. P., Nahorniuk, C. S., et al., 1986, Interactions of catecholamines and GnRH in regulation of gonadotropin secretion in teleost fish, *Recent Prog. Horm. Res.*, **42**: 513—548.
- Sherwood, N. M. 1987, The GnRH family of peptides, *Trends Neurosci.*, **10**: 129—132.
- Stojilkovic, S. S., Izumi, S. and Catt, K. J., 1988, Participation of voltage sensitive calcium channels in pituitary hormone release, *J. Biol. Chem.*, **263**: 13 054—13 061.

## EFFECTS OF EXTRACELLULAR CALCIUM AND POTASSIUM ON THE REGULATION OF GONADOTROPIN SECRETION FROM PITUITARY OF COMMON CARP *IN VITRO*

Lin Xinwei, Li Yingwen, Lin Haoran

(Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

### ABSTRACT

The effects of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  on the basal and salmon GnRH (sGnRH)-stimulated gonadotropin (GtH) release from pituitary of the common carp (*Cyprinus carpio*) were studied by using an *in vitro* perfusion system for pituitary fragments. The basal GtH release from the common carp's perfused pituitary extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -independent. The GtH release from the common carp's perfused pituitary in response to 2 min pulses of sGnRH (1, 10, 100 n mol/L) was extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent; in the absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  or the reduction in  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, the significant decreases in the GtH release responses to sGnRH were observed. Voltagesensitive calcium channels (VSCC) and antagonist verapamil (VER) dosedependently and significantly inhibited GtH release responses to 2 min pulses of sGnRH, in a VER was ineffective on the basal GtH secretion. These results indicate that the effect of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  on the GtH-releasing action of sGnRH is, at least, partially through the action of VSCC. 50 m mol/L  $\text{K}^{+}$  significantly stimulated the basal GtH release from the perfused pituitary of the common carp, and the action of  $\text{K}^{+}$  was time- and extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent. Moreover, no significant influence of increased concentration of  $\text{K}^{+}$  on sGnRH-induced GtH release was observed.

**Key words** Salmon GnRH Gonadotropin Calcium Potassium Perfusion Common carp