

# 贝类神经内分泌学研究进展

王春德

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

双壳类的神经系统通常由 3 对神经节组成, 即脑神经节、足神经节和脏神经节。近几年的研究已经在贝类神经节及其他组织中发现了许多具有激素作用的生物活性物质, 其中大多为生物活性肽类(BAP)<sup>[18]</sup>。它们大多以某种脊椎动物激素类似物来命名, 这一方面反映了其同源性, 另一方面也是因为它们的确具有相似的特性和作用。

生殖的神经内分泌调控在动物界是十分广泛的, 贝类也不例外<sup>[15]</sup>。双壳类动物与脊椎动物神经内分泌作用的最大差异, 在于前者的神经激素直接作用于靶组织, 而后者则往往通过其他神经内分泌器官作用于靶组织<sup>[10]</sup>。在脊椎动物内分泌作用中, 一般都存在着反馈机

制。在贝类, 有关神经内分泌反馈机制的报道尚没有见到, 但这并不意味着贝类的神经内分泌调控机制比脊椎动物的简单, 相反, 其作用方式十分多样复杂。

## 1 研究方法

在贝类神经内分泌研究中常用的方法包括:

1.1 染色方法 常用于神经分泌细胞的定位和神经内分泌系统的形态学研究。

1.2 切除和移植实验 为了证明某些神经内分泌器官的调控作用, 过去常常采用这种方法。但这种方法在双壳类中用处不大, 因为手术常常引起贝类损伤。

1.3 细胞和器官培养方法 通常也是用来证明神经内分泌器官的调控作用,常用固体培养基,以比较靶组织单独培养或与神经节一起培养的组织学变化。这种方法只能用于定性研究,很难得到可重复的定量结果,而且由于外植体的异质性及神经激素从培养的神经节向其他组织扩散的不均一性,实验往往需要大量重复,才会得到具有统计学意义的结果<sup>[10]</sup>。

1.4 生物化学方法 主要用于神经激素的提取、分离、纯化和特性的研究。常用层析分离法来纯化神经激素,包括粒选、离子交换和层析聚焦等步骤,但需要的样品量较大,如对于贻贝,每次层析分析需要1 000~1 500个脑神经节。近年来,一些先进的分析技术正被引入贝类神经激素的鉴定和纯化中。Reis-Henriques等用气质联用色谱法(GS-MS)和放射免疫分析(RIA)等方法,在贻贝(*Mytilus edulis*)中分离鉴别出8种甾醇类化合物,证明在贝类中也有性激素存在<sup>[15]</sup>,高效液相色谱(HPLC)被用于前列腺素类和单胺类(多巴胺和去甲肾上腺素)的分析中<sup>[13,14]</sup>。

1.5 细胞免疫化学方法(IC) 细胞免疫化学方法在肽能系统的研究中十分重要,利用IC可以证明细胞

中某些神经分泌产物的存在及其在神经元中的转移,IC还是不同类型细胞定位的重要手段。多肽抗体在细胞免疫化学中的应用,使某些未知生物活性多肽(BAP)的分离和鉴定成为可能,应用这种方法已在贻贝中鉴定出脑啡肽类似物、 $\alpha$ MSH类似物等的存在。获得贝类神经激素免疫学特征的另一条途径是制备脑神经节提取液的单克隆重抗体<sup>[16]</sup>,可以通过选择在细胞免疫化学中只识别一种神经分泌细胞类型的抗体,来筛选某种激素的单克隆重抗体。应用这种方法, Van Minnen 和 H. H. Boer 制备了 *L. stagnalis* 整个中枢神经系统提取液的单克隆重抗体(ALMA),并将ALMA用于生物活性物质的分离纯化中,定位了产生排泄激素的尾背的细胞(CDC)、产生生长激素的浅绿色细胞(LGC)和产生雌性促性腺激素的背体(DB)<sup>[18]</sup>。

## 2 神经激素

在贝类中已发现或已分离纯化的神经激素种类繁多,下面仅以贻贝为例列表1,表2。

表1 在贻贝(*Mytilus edulis*)中已发现的神经激素

| 神经激素            | 来源                    | 作者                                                        |
|-----------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------|
| 生长激素释放抑制因子      | 脑神经节和血淋巴生殖腺小管         | Mathieu and Van Minnen, 1989                              |
| CCK类似物          | 脑神经节                  | 同上                                                        |
| FMRFa类似物        | 脑神经节足神经节              | 同上 Martin <i>et al.</i> , 1986                            |
| $\alpha$ MSH类似物 | 足神经节                  | Martin <i>et al.</i> , 1986                               |
| hCG类似物          | 血淋巴                   | Martin <i>et al.</i> , 1991                               |
| 脑啡肽类似物          | 脑、足、侧神经节<br>消化腺和消化道上皮 | Anderson <i>et al.</i> , 1986 Martin <i>et al.</i> , 1986 |
| 内啡肽类似物          | 消化道                   | Anderson <i>et al.</i> , 1986                             |
| 性激素*            | 整体                    | Reis-Henriques <i>et al.</i> , 1990                       |

\* 包括孕激素、雄烯二酮、睾酮、5 $\alpha$ -脱氢睾酮、17 $\beta$ -雌二醇、雌酮和雄烷二酮。

表2 在贻贝(*Mytilus edulis*)中已分离纯化的神经激素

| 神经激素               | 来源          | 性质            | 分子量    | 作者                                                |
|--------------------|-------------|---------------|--------|---------------------------------------------------|
| 促生殖原细胞有丝分裂因子(GMSF) | 脑神经节        | 酸溶性、亲水性、热稳定性  | <5kDa  | Mathieu, 1985, 1987; Mathieu <i>et al.</i> , 1988 |
| 糖原转运激素             | 脑神经节侧神经节血淋巴 | 部分热稳定性被胰蛋白酶失活 | >20kDa | Mathieu <i>et al.</i> , 1991                      |
| 促糖原合成因子            | 脑神经节        |               | 1.5kDa | Maehiwi <i>et al.</i> , 1991                      |
| 促糖白合成因子            | 脑神经节        | 亲水性多肽         | 1kDa   | Toullec <i>et al.</i> , 1988                      |

### 3 有关调控

#### 3.1 生殖调控

细胞化学研究将神经分为  $a_1, a_2, a_3$  和  $a_4$  类<sup>[3]</sup>, 并发现  $a_1$  型细胞的神经分泌周期与配子发生的周期密切相关, 说明这些细胞可能在生殖调控中起作用。所有神经节都含有  $a_1$  型细胞, 其中脑神经节含有 75% 的  $a_1$  型细胞。Lubet 的发现切除脑神经节可引起配子释放, 这可以解释为脑神经节里存在着一个排解抑制因子, 当然也可能是由于手术引起脑神经节中促排解因子的释放<sup>[4]</sup>。通过采用固体培养基的器官培养实验, Lubet 和 Mathieu 证明贻贝的脑神经节具有促性腺的功能, 生殖原细胞有丝分裂, 雄性生殖细胞减数分裂的重新启动, 雌性生殖细胞卵黄发生前期和卵黄发生期都是由脑刺激的。脏神经节也有这种功能, 但不如前者重要<sup>[5,6]</sup>。到目前为止, 已在贻贝的脑神经节神经节和血淋巴中分离纯化到了一个促生殖原细胞有丝分裂因子(GMSF), 可在 C18 反相柱上分离, 用甲醇洗脱, 说明其具有亲水性。这个因子可促进生殖原细胞的 DNA 合成, 提高性腺的 ATC 酶活性<sup>[10]</sup>。有意义的是, 在贻贝中也已鉴定出 8 种性激素。它们的含量与生殖周期密切相关, 说明性激素参与贻贝的生殖调控<sup>[15]</sup>。性激素可能通过调节内源单胺类的代谢而起作用<sup>[14]</sup>。单胺类(如多巴胺)和血清素(5-HT)参与扇贝(*Patinopecten yessoensis*)的生殖调控, 在脑神经节或生殖腺中已发现许多血清素能神经元, 并已鉴定出有内源 5-HT、多巴胺和去甲肾上腺素存在。在生殖期多巴胺的含量很高, 产卵后含量下降<sup>[14]</sup>。应用 HPLC 技术, Osada 等在 *P. yessoensis* 脑神经节和生殖腺中发现 5 种前列腺类物质, 其中  $PGF_2\alpha$  在生殖期卵巢中含量很高, 产卵时则明显下降<sup>[13]</sup>。Matsutani 等认为高含量的  $PGF_2\alpha$  可以在卵子成熟前阻止排卵, 直到其发育成熟, 当卵发育成熟后 5-HT 或多巴胺释放, 阻止  $PGF_2\alpha$  继续产生, 开始排卵<sup>[12]</sup>。升温可提高 5-HT 的含量, 因此升温或注射 5-HT 的含量都可引起排卵。紫外线处理的海水和  $H_2O_2$  也通过多巴胺能——血清素能机制诱导排卵。目前, 这个结果已被广泛应用到贝类的人工养殖上, 利用温变刺激、紫外线照射海水和  $H_2O_2$  等可有效促进性腺发育, 诱导产卵。

#### 3.2 糖原代谢的神经调控

器官培养实验证明, 脑神经节可促进糖原转运, 而脏神经节则可促进糖原合成<sup>[19]</sup>。Robbins 已从脑神经节的酸抽提物中鉴定出一个糖原转运激素(GMH)<sup>[16]</sup>。GMH 通过剂量依赖方式抑制糖原合成, 促进糖原转运。

在血淋巴中也发现具有 GMH 活性。有趣的是, 在 GMH 的色层分离中, 还同时发现了一个具有拮抗作用的因子, 只不过其作用在未分离的抽提物中被 GMH 所掩蔽。在贻贝, 糖原的转运和储藏周期与其生殖调控的年周期密切相关。这种代谢由内分泌调控, 因而也与生殖调控有关。

#### 3.3 生长调控

1971 年, Lubet 首次在履螺 *Crepidula fornicata* 中发现了一个贝类生长激素。应用包含所有细胞类型的外套膜边缘体细胞酶解悬浮液, 醋酸铵缓冲液从贻贝脑神经节中鉴定出一个蛋白合成激活因子(PSAF), 在血淋巴中也存在着一个类似的因子。它们以剂量依赖的方式作用于体细胞, 同时又可促进 RNA 和 DNA 的合成。有意义的是, 这个因子并不是种特异的, 它对于其他双壳类也有活性<sup>[17]</sup>。

### 4 展望

神经激素的提纯可望在水产养殖上得到广泛的实际应用。第一, 神经激素可用于养殖种类的性成熟控制、幼虫和幼贝的生长, 以及营养效率的提高, 因而可能对双壳类的育苗和中间暂养有用。剩下的主要问题是给药的方法, 是通过食物途径还是直接施药于水环境中。第二, 有些神经激素已得到完全分离纯化, 并已获得其氨基酸顺序, 如已经知道 *L. stagnalis* 的排卵激素(CDCH)由 36 种氨基酸组成<sup>[2]</sup>。这就为人工合成这些激素提供了可能性。尤其重要的是, 已知氨基酸顺序, 就可以人工合成其 mRNA, 进一步合成 cDNA, 这将为基因工程在水产养殖上的应用带来极大的方便, 因而具有广泛的应用前景。

我国在贝类神经内分泌学研究方面基本上还是空白, 国内尚无人进行这方面的工作。随着贝类养殖业的发展, 许多生产上的问题需要从神经内分泌学上来解决, 开展这方面的研究已成为当前的急需。我国在高等动物神经内分泌方面的许多研究处于世界领先地位, 基础雄厚。由于贝类神经内分泌学与高等动物神经内分泌学的相似性, 许多研究技术和方法可以借鉴, 这对我们开展贝类神经内分泌学研究工作是一个有利条件。

#### 参考文献

- [1] Andrsen, A. C, et al., 1986. *Mytilus edulis*. Gen. Comp. Endocrinol. 62 (1): 111-119.

- [2] Ebberink, R. H. M. *et al.*, 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.*, **82**:7 767-7 771.
- [3] Lanes, J. *et* Lubet, P. 1980. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **105** (1):141-145.
- [4] Lubnet, P., 1959. *Rev. Trav. Inst. S. T. P. M., Paris* **23**(4):396-545.
- [5] Lubet, P. *et al.*, 1982. *Malacologia*, **22**(1-2):131-138.
- [6] Mathieu, M., 1985. *Mytilusedulis. J. Exp. Zool.*, **241**:247-252.
- [7] Mathieu, M., 1987. *Mytilusedulis. J. Exp. Zool.* **241**:247-252.
- [8] Mathieu, M. *et al.*, 1988. *Mytilusedulis. Gen. Comp. Endocrinol.* **72**:257-263.
- [9] Mathieu, M., *et al.*, 1989. *Mytilusedulis. C. R. Acad. Sci., Paris*, **308**:489-494.
- [10] Mathieu, M. *et al.*, 1991. *Mytilusedulis. Aquaculture*, **94**: 213-223.
- [11] Mathin, R., *et al.*, 1986. CRC Press, Boca Raton. FL. 49-64.
- [12] Matsutani, T. *et al.*, 1986. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **52** (9):1 589-1 594.
- [13] Osada, M. *et al.*, 1989. *Biochem. Physiol.* **94C**(2):595-601.
- [14] Osada, M. *et al.*, 1989. *Biochem. Physiol.* **93C**(1):171-173.
- [15] Reis-Henriques, M. a. ETAL., 1990. *Biochem. Physiol.* **95B** (2):303-310.
- [16] Robbins, I., *et al.*, 1990. *Endocrinol.* **79**:123-129.
- [17] Tqullec, J. Y. *et al.*, 1988. *Mytilusedulis. J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **119**:111-117.
- [18] Van Minnen, J. and Boer, H. h., 1987. *Biol. Med. Sci.* **90**(2):193-201.
- [19] Whittle, MA. *et al.*, 1983. North- Holl and Publ., Amsterdam, 183.