

黄鳝血清褪黑激素水平日周期性与季节性变化的节律

石琼 林浩然

邓柏礼

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

(香港理工大学应用生物及化学科技学系, 香港九龙)

摘要 通过放射免疫测定方法, 本文初步研究了黄鳝血清褪黑激素的分泌特性。实验结果表明, 黄鳝血清褪黑激素水平具有明显的日周期性与季节性变化节律。白天血清中褪黑激素水平较低, 夜间浓度显著升高, 比白天值高1~2倍。随着性腺的发育, 从卵巢Ⅱ至Ⅳ期, 血清中褪黑激素含量逐渐升高, 到排卵前期则急剧下降, 排卵期达到雌性阶段的最低值, 排卵后期, 血清褪黑激素水平又逐渐回升; 间性期则有下降的趋势; 雄鱼血清中褪黑激素水平极低。褪黑激素水平的季节性变化结果显示, 内源性褪黑激素可能参与黄鳝的性转变进程。

关键词 黄鳝, 血清褪黑激素, 节律

中图分类号 S917.4

从单细胞生物到高等脊椎动物, 普遍存在褪黑激素或褪黑激素类似物。到目前为止, 在大多数被研究过的生物中, 褪黑激素的合成在光照条件下受到抑制。Balzer 等[1995]从进化的角度指出, 生物在黑暗条件下积聚褪黑激素的原发作用可能主要是用于对光照产生的自由基的防护。Bolliet 等[1994]认为, 褪黑激素的节律性合成受体生物钟或日周期性活动的生物振荡器调控。血液中褪黑激素的周期性是产生器官分泌活动节律性的反映, 因此揭示该节律对研究褪黑激素的生理作用和探讨松果腺(大多数动物体内褪黑激素的主要来源器官)的生理功能具有积极的意义。黄鳝是一种常见的先雌后雄的性转变鱼类, 但迄今有关性转变机制尚未明了。诸多研究表明, 鱼类褪黑激素参与调节季节性生殖活动[Zachmann 等 1992], 故笔者推测, 褪黑激素可能参与黄鳝的性转变进程。本文应用放射免疫测定技术, 对黄鳝血清褪黑激素水平的日周期性和季节性进行探讨, 以了解黄鳝体内褪黑激素的分泌特性, 并为深入研究褪黑激素在性转变过程中的作用奠定基础。

1 材料与方方法

1.1 实验动物和血清制备

1.1.1 黄鳝血清的日周期性采集

香港理工大学合作课题 HKPU 340/845 资助项目。

收稿日期: 1998-10-14

黄鳝, 体长30~35cm, 分别于1995年3月、5月和1996年4月购自广州晓港农贸市场。取血前, 在实验室内自然条件下暂养一周。3月与5月的光周期分别为 LD12:12(光照06:30~18:30h)和 LD13:11(光照06:00~19:00h), 水温分别是18~21℃与23~29℃。1996年4月的光照时间为06:00~18:30h, 水温19~23℃。实验结束时, 经组织切片镜检鉴定卵巢发育状态为 I 期、排卵前期和 N 期, 成熟系数 GSI 值(%)分别为 0.305±0.118、8.106±2.270和0.819±0.145。

暂养一周后, 间隔1~4小时, 分别在为期一天的不同时间(图1)取血样。图1中每点用8~10条鱼所得结果的平均值±标准差异来表示。平行于 X-轴的黑杆与白杆分别表示黑暗时间与光照时间。曲线 A、B 和 C 分别是卵巢 I 期(3月; 光照06:30~18:30h, 水温18~21℃)、卵巢 N 期(4月; 光照06:00~18:30h, 水温19~23℃)和排卵前期(5月; 光照06:00~19:00h, 水温23~29℃)黄鳝个体所显示的昼夜分泌情况。

晚上取血样时在7.5W 红灯下(30cm 距离)进行。具体步骤如下: 置0.05%的 MS-222溶液中麻醉, 从尾静脉取血(约1毫升/条鱼)。在4℃冰箱中静置数小时后, 16000rpm 离心10分钟分离血清, 储于-20℃冰柜中保存, 供放射免疫测定使用。

1.1.2 黄鳝血清的季节性采集

雌性和间性黄鳝分别于1995年3、4、5、7、9月份购自广州晓港农贸市场, 雄性黄鳝则于1995年11月和12月买自香港九龙红磡市场。取血前, 置实验室内暂养一周。实验结束时经组织切片镜检性腺发育状态, 鉴定标准参照

Chan 和 Phillips[1967]。本文以大多数黄鳝所处的时相作为季节性变化的性腺发育标准时期 [Chan 和 Yeung 1989], 各期使用黄鳝的有关生物学参数及饲养条件列于表1。午夜时, 将实验用鱼麻醉后, 从尾静脉取血。血清制备同前, 冰柜保存备用。

1.2 褪黑激素的放射免疫测定

用二氯甲烷从血清样品中抽提褪黑激素, 然后用放射免疫测定方法测量血清中褪黑激素含量。具体步骤简述如下: ①抽提褪黑激素: 吸取1mL 待测样品置10mL 离心管中, 加入5mL 二氯甲烷, 旋转搅拌。16000rpm 离心15分钟后, 去掉水相及脂肪层, 转移下层的萃取液至大试管中, 置通风橱中干燥或用液氮吹干。②建立标准曲线: 用0.5mL 标准曲线系列溶液建立褪黑激素(美国 Sigma 公司产品)放射免疫测定的标准曲线。③放射免疫测定: 向盛有抽提样品的大试管中加入1.2mL 磷酸缓冲(0.05mol/L, pH7.5), 振荡后分成3个平行小管, 向各小管中依此

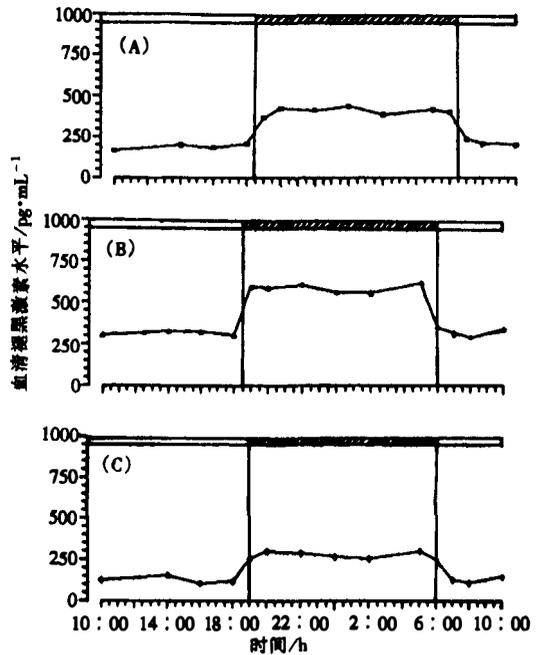


图1 黄鳝血清中褪黑激素水平的日周期性变化节律

Fig. 1 Diel profiles of circulating melatonin in the ricefield eels

加入 $50\mu\text{L}^3\text{H}$ -褪黑素(2500CPM/ $50\mu\text{L}$, 购自英国 Amersham 公司)和 $50\mu\text{L}$ 褪黑激素抗血清(加拿大 CIDtech 公司产品)。再次振荡, 室温下放置约1小时后转移至 4°C 冰箱中孵育过夜。翌日, 向各管中加入 0.75mL 新鲜过滤后的饱和硫酸铵溶液(pH7.0)和 $50\mu\text{L}$ 兔血清(1:20), 振荡混匀。 4°C 冰箱中放置60分钟后, 4000rpm 离心45分钟。弃上清液, 向底层沉淀物中加入 $300\mu\text{L}$ 的重蒸水, 振荡混匀。从各管中移出 $300\mu\text{L}$ 样品, 并同 $100\mu\text{L}$ 重蒸水转移至相应编号的闪烁管中。向各闪烁管中加入 4mL 闪烁液, 静置过夜后放入液体闪烁测定仪中测量。本放射免疫测定方法的灵敏度为 $5\text{pg}/\text{管}$, 批内差异为 6.2% ($n=7$), 批间差异为 16.5% ($n=8$)。

1.3 统计分析

血清中褪黑激素的含量均表示为平均值 \pm 标准差。各期结果用 Duncant 氏多重检验比较, 如果 $p<0.05$, 则认为数值差异显著。

表1 实验黄鳝的有关生物学参数及饲养条件

Tab. 1 Biological parameters and cultured conditions of the experimental ricefield eels

实验月份	性腺发育时期	体重(克)	成熟系数(%)	光照时间	水温($^\circ\text{C}$)
三月	I	16~22	0.075 ± 0.013	0630~1830	13~16
四月	II	20~26	0.671 ± 0.279	0630~1830	21~24
四月	IV	30~34	0.730 ± 0.271	0630~1830	21~24
五月	V	23~35	8.218 ± 3.548	0600~1900	23~28
五月	S	20~31	—	0600~1900	24~28
六月	PS1	26~32	0.687 ± 0.128	0530~1930	26~29
九月	PS2	25~33	0.537 ± 0.230	0600~1900	17~19
九月	IN	28~34	0.428 ± 0.155	0600~1900	17~19
十一月	M1	73~97	0.153 ± 0.024	0630~1830	16~19
十二月	M2	89~125	0.092 ± 0.016	0630~1830	15~18

注: I, II, IV, 卵巢静止期; V, 排卵前期; S, 排卵期; PS, 排卵后期; IN, 间性期; M, 雄性期。1和2分别表示某个时期的早期与晚期阶段。

2 结果与讨论

2.1 黄鳝血清褪黑激素水平的日周期性变化

由图1可见, 黄鳝血清褪黑激素水平具有明显的日周期性变化节律: 白天水平低, 晚上浓度显著升高。白天血清中褪黑激素水平相对较低, 而且比较稳定。傍晚时水面光照强度迅速降低, 褪黑激素水平则开始急剧增加, 在光照结束后 $0.5\sim 1$ 小时出现平台期, 并一直持续到光照开始。午夜时血清褪黑激素水平比白天值高 $1\sim 2$ 倍。清晨光照强度快速增加, 黄鳝血清褪黑激素水平在半小时内又迅速回降至基础水平。

本文三次实验所得到的节律性相似, 变化不大, 可能与光周期相差不大有关。但幅度相距较远, 则可能是由于性腺发育状态和温度等不同的缘故。光照结束后(夜间), 黄鳝血清中褪黑

激素水平明显升高;而光照开始后(白天),褪黑激素水平又迅速降低,表明光照对褪黑激素的合成具有抑制作用。在不同生物当中,夜间褪黑激素的变化方式不同。Reiter[1987]根据这种不同的分泌方式将哺乳动物分成三大类。同梭子鱼、虹鳟和大西洋鲑等类似,黄鳝血液中褪黑激素呈现的昼夜节律近似于第三类,即黑暗开始后褪黑激素水平快速增加,然后保持着高浓度水平,在光照开始后又迅速回降至基础水平。

夜间光照对松果腺褪黑激素分泌活动的抑制效应很快,使松果腺褪黑激素水平降至一半的时间约在20分钟左右[Bolliet 等 1995]。本文实验结果也表明,在光照开始后半小时内黄鳝血清褪黑激素水平就可迅速降低至基础水平。由于褪黑激素在松果腺合成后就立即释放入血液中[Reiter 1987],而血清中褪黑激素消除速度快[Vaughan 等 1986],所以对松果腺作为血清中褪黑激素主要来源的动物来说,血清中褪黑激素水平与松果腺内褪黑激素水平的比值就会相对稳定。石琼等[1996]已证实黄鳝脑部松果腺复合体的存在。如果黄鳝血清中的褪黑激素也主要来自松果腺的话,那么就不难理解本文报导的血清褪黑激素对光照的反应时间与光照抑制松果腺的效应时间相近的现象。

2.2 黄鳝血清褪黑激素水平的季节性变化

黄鳝血清中褪黑激素水平,除了具有日周期性节律外,还呈现出季节性变化规律(图2),即从卵巢Ⅱ至Ⅳ期,血清中褪黑激素含量逐渐升高,到排卵前期(V期)急剧下降,排卵期(S)达到雌性阶段的最低值(185.48±33.75pg/mL);排卵(PS)后,血清褪黑激素水平又逐渐回升;间性期(IN)水平则有下降的趋势;雄鱼(M)血清中褪黑激素的水平极低。

黄鳝血清褪黑激素水平的季节性变化基本与李英文(1995)测定的下丘脑 GnRH 含量变化相平行。这两种激素变化之间的平行性,可能暗示着功能上的某种相关性。也就是说,褪黑激素可能参与调节下丘脑 GnRH 的合成与分泌,进而影响黄鳝的性腺发育。雄性血清的褪黑激素水平较低,可能是由于老化以及个体增大导致血液中褪黑激素的稀释倍数增加[Pang 等,1990]的缘故。

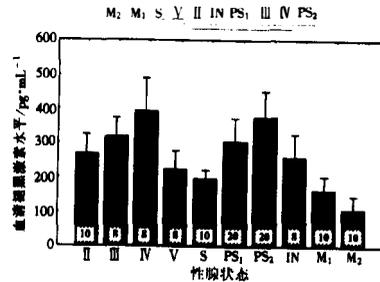


图2 黄鳝血清中褪黑激素水平(午夜)的季节性变化规律

Fig. 2 Serum melatonin profile (mid-dark) of the ricefield eel

注:形框内数值为取样鱼数。性腺发育状态:ⅡⅢⅣ,卵巢静止期;V,排卵前期;S,排卵期;PS,排卵后期;IN,间性;M,雄性。1和2分别表示某一时期的早期与晚期阶段。

(1)李英文. 1995. 黄鳝性转变的内分泌学研究——脑区 GnRH 的分布与变化及 GnRH 分泌的离体研究. 广州:中山大学博士学位论文。

此外,鱼体成熟系数(性腺重与体重的百分比值)也显示出季节性周期变化。卵巢静止期内,从Ⅱ至Ⅳ期呈逐渐上升趋势,在排卵前期急增升至最大值,排卵后迅速下降(图3)。在排卵前期,黄鳍血清褪黑激素水平达低谷值,而GSI则处于高峰值,这种现象也许暗示着此期之前生理高水平的血清褪黑激素对黄鳍性腺发育具有抑制作用。有关褪黑激素参与黄鳍性转变的作用及机制,有待进一步研究。

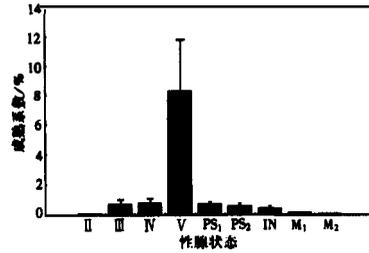


图3 黄鳍成熟系数(GSI)的季节性变化

Fig. 3 Seasonal variation of the gonadosomatic index(GSI)of the ricefield eels maintained

石琼现为北京师范大学生物学系博士后。

参 考 文 献

- 石 琼,林颖华,林浩然. 1996. 黄鳍松果腺复合体的超显微结构研究. 中山大学研究生学刊, 17(4): 8~15
- Balzer I, Behrmann G, Hardeland R. 1995. Evolutionary significance of the presence of melatonin in unicells and plants. CAPs News Communication, 14(suppl 2): 1~2
- Bolliet V, Begay U, Ravault J P, et al. 1994. Multiple circadian oscillators in the photosensitive pike pineal gland: A study using organ and cell culture. J Pineal Res, 16: 77~84
- Bolliet V, Falcon J, Ali M A. 1995. Regulation of melatonin secretion by light in the isolated pineal organ of the white sucker (*Catostomus commersoni*). J Neuroendocrinol, 7: 535~542
- Chan S T H, Phillips J G. 1967. The structure of the gonad during natural sex reversal in *Monopterus albus* (Pisces: Teleostei). J Zool Lond. 151: 129~141
- Chan S T H, Yeung W S B. 1989. Sex steroids in intersexual fishes. Fish Physiol Biochem, 7(1~4): 229~235
- Pang S F, Lee P P N, Chan S T H, et al. 1990. Fluctuation of blood melatonin concentrations with age, results of change in pineal melatonin secretion, body growth, aging. J. Pineal Res, 8: 179
- Reiter. 1987. The melatonin message: Duration versus coincidence hypotheses. Life Sci, 40: 111~116
- Vaughan G M, Madson A D, Reiter R J. 1986. Serum melatonin after a single aqueous subcutaneous injection in Syrian hamsters. Neuroendocrinology, 42: 124~127
- Zachmann A, Ali M A, Falcon J. 1992. Melatonin and its effects in fishes, An overview. In: Rhythms in Fishes. M. A. Ali, ed. Plenum Press, New York. 149~165

DIEL AND SEASONAL RHYTHMS OF SERUM MELATONIN LEVEL IN *MONOPTERUS ALBUS*

SHI Qiong, LIN Hao-Ran

(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

TANG Pak-Lai

(Department of Applied Biology and Chemical Technology, The Hong Kong Polytechnic University,
Kowloon, Hong Kong)

ABSTRACT With a radioimmunoassay for melatonin, the secretional characteristics of serum melatonin in the ricefield eel, *Monopterus albus* Zuiew were studied. The results show that serum melatonin levels in the ricefield eels demonstrated a clear daily cycle and changed seasonally. The diel rhythm was characterized by a rapid increase almost immediately (0.5—1 hour) after the onset of darkness, maintenance of high levels for the duration of the night, and a rapid decline to basal levels (about 1/2—1/3 of the nighttime amplitude) at the time of light onset. Dramatic seasonal variation in amplitude of the nocturnal increase was found in the serum too. The serum melatonin levels of female ricefield eels increased significantly accompanied with ovarian development, and reached its highest level at the fourth stage of ovarian maturation, but then decreased rapidly at the prespawning stage. After spawning, serum melatonin levels elevated again. During sex-reversal process, serum melatonin levels decrease gradually, and the lowest values were recorded in the mature males. The seasonal rhythm suggests that endogenous melatonin appears to be involved in the process of sex reversal in the ricefield eel.

KEYWORDS *Monopterus albus*, serum melatonin, rhythm