

文章编号: 1004-7271(2003)03-0274-04

·研究简报·

肾上腺素和去甲肾上腺素对鲫鱼离体培养的 肝组织 5'-MDA 活性的影响

The effect of epinephrine or norepinephrine
on the 5'-monodeiodinase activity *in vitro* incubations
of liver slice of *Carassius auratus* Linnaeus

龚小玲¹, 李 巍¹, 鲍宝龙¹, 许安阳²

(1. 上海水产大学渔业学院, 上海 200090; 2. 华南农业大学, 广东 广州 510642)

GONG Xiao-ling¹, LI Wei¹, BAO Bao-long¹, XU An-yang²

(1. Fisheries College, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

关键词: 肾上腺素; 去甲肾上腺素; 5'-单脱碘酶活性; 鲫鱼

Key words: epinephrine(E); norepinephrine(NE); 5'-monodeiodinase(5'-MDA) activity; *Carassius auratus* Linnaeus

中图分类号: S917 文献标识码: A

甲状腺素是一种非常重要的内分泌激素,它与鱼类的变态、生长、代谢、渗透压的调节等都有密切的关系^[1]。Letherland 等^[2]通过实验验证在虹鳉鱼类肝脏和肾脏的组织细胞中含有一种 5'-单脱碘酶(5'-MDA),它可使从血浆中释放到肝组织中的 T₄ 通过脱碘作用转化为生物活性高的 T₃。这种 5'-MDA 的活性受一些儿茶酚胺类激素的影响,从而可以使机体运用儿茶酚胺类激素通过调节 5'-MDA 的活性来影响外周 T₃ 的生成^[3]。本工作运用离体方法研究了儿茶酚胺类激素(肾上腺素 E 和去甲肾上腺素 NE)对鲫鱼肝组织的 5'-MDA 在调节 T₃ 形成过程中的影响,以期为今后研究激素对鱼类肝酶系统的影响提供直接的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验用鱼

实验鲫鱼(*Carassius auratus* Linnaeus)购自图门市场,购回的鲫鱼先在实验室内暂养 1 个月左右,暂养期间,温控在 16~19℃,每天投饵三次,每天提供 12h 光照。实验前,选三尾鱼作为实验材料,三尾鱼性腺均已成熟,且均为雌性,它们的湿重和全长分别为 150.0g、186.5g、150.4g 和 19.0cm、22.0 cm、18.0 cm。

1.2 培养液和储备液

培养液和储备液的配制按参考文献[4]进行。

1.2.1 基本培养液 A 的配制

精确称取 1640 粉剂 1.0400g,溶于蒸馏水中定溶制 100mL,后加入 20 mL 的胎牛血清,搅拌均匀,再称取青霉素、链霉素各 0.0072 g、0.0120 g 加入到上述溶液中搅拌均匀,即可配成基本培养液 A。

1.2.2 含肾上腺素 0.5mM、0.05mM 培养液 B₁、B₂ 的配制

取 24 mL 基本培养液 A,加入 0.0022 g E,搅拌均匀即得含肾上腺素(epinephrine,以下简称 E) 0.5mM 的培养液 B₁,取培养液 B₁ 2mL 用基本培养液 A 稀释 10 倍,即可得含 E 0.05mM 的培养液 B₂。

1.2.3 含去甲肾上腺素 0.5mM、0.05mM 培养液 C₁、C₂ 的配制

取 24 mL 基本培养液 A,加入 0.0020 g 去肾上腺素(norepinephrine,以下简称 NE),搅拌均匀即得含 NE 0.5mM 的培养液 C₁,取培养液 C₁ 2mL 用基本培养液 A 稀释 10 倍,即可得含 NE 0.05 mM 的培养液 C₂。

1.2.4 T₄ 储备液的配制

称取 4.078612mg T₄ 溶于 10mL 的蒸馏水中,取出 1mL 定溶到 500mL,即为 1.05×10^{-6} M 的 T₄ 储备液。

1.3 肝组织的离体培养

取出暂养鲫鱼敲击头部使之昏迷,量体长、称湿重后立即解剖,取出肝脏,在 0.1M 磷酸缓冲液(pH 7.6)中清洗,剪碎肝组织(大小 1mm³左右),分别分散于含 3mL 培养液 B₁、B₂、C₁、C₂ 的培养皿中,盖上盖子,放入 13.8℃ 恒温箱中培养 3h,取出,称重,在 0.5 mL 冷磷酸缓冲液中匀浆,匀浆液一份作 5'-MDA 活性测定,另一份保存于 -20℃ 冰箱中用于蛋白质含量测定。实验设空白对照、0.5 mM E、0.5 mM NE、0.05 mM E、0.05 mM NE 五组,每组设有 3 个平行组。

1.4 T₃ 的测定

取 0.1M 的二硫苏糖醇(DTT)磷酸缓冲液 60μL(使 DTT 在溶液中的最终浓度为 10mM)放入 2 mL 的离心管中→加入 390μL 的磷酸缓冲液(pH 7.0),再加入 150μL 组织匀浆液和 30μL T₄ 储备液(使 T₄ 在溶液中最终浓度为 50nM)→离心管放入 12℃ 水浴中 20min 取出→加入 400μL 的冷乙醇→在 4℃ 下过夜→1400 × g 低温离心 20min→上清液转入洁净的离心管中真空干燥⁵¹→RIA 法测定 T₃ 的含量(T₃ 的含量由同济大学放射免疫中心测定)。

1.5 蛋白质含量的测定

蛋白质含量的测定采用 Folin 酚法。

1.6 5'-MDA 活性的计算公式

$$5'-MDA \text{ 活性} = T_3(\text{nmol}) / \text{蛋白质}(\text{mg}) / \text{h}$$

2 结果

5'-MDA 的活性是根据单位肝组织中 T₃ 含量、蛋白质含量及酶反应的时间计算所得,各实验数据见表 1。

表 1 中,各实验组中的组织块的重量存在着一定的差异,但多数均在 0.2700 ~ 0.3200g 之间,经单因子方差分析,各组间的组织块的重量无显著差异($F_{(2,10),0.05} = 3.478 > F = 1.980$)。同一培养液中的 3 个平行组之间, T₃ 的含量基本随组织块重量的增加而增加,因不明原因造成 NE 两个浓度处理组下各有 1 个 T₃ 的含量为 0 的值。NE 两个不同浓度处理组若剔除 0 值,可以看出它们之间的差异也很显著,随着 NE 和 E 浓度的提高, T₃ 的含量也就越高,且相同浓度下,NE 处理组 T₃ 的含量高于 E 处理组。各实验组中,蛋白质的含量基本上是随组织块重量的增加而增加。5'-MDA 活性的平均值在空白对照组中最低,随 E、NE 浓度的提高,活力增强,同浓度下,NE 对 5'-MDA 活性的影响强于 E 的作用,对 E 的两个不同浓度处理组和空白对照组之间进行方差分析结果表明,它们之间的差异也很显著($F_{(2,6),0.01} =$

10.9248 < F = 53.2046) ;NE 两个不同浓度处理组若剔除 0 值,可以看出它们之间的差异也是显著的,随着 NE 和 E 浓度的提高,5'-MDA 活性明显增强,相同浓度的 E、NE 的处理组别,后者 5'-MDA 的活性明显高于前者。

表 1 实验组中肝组织重量、T₃ 含量、5'-MDA 活性及 5'-MDA 活性均值

Tab.1 The weight, T₃ content, 5'-MDA activity and 5'-MDA activity average value of liver slice

组别	管号	肝组织重量 (g)	T ₃ 含量 (× 10 ⁻⁵ nmol/mL)	蛋白质浓度 (mg/mL)	5'-MDA 活性 (× 10 ⁻⁵ nmol/mg protein/h)	5'-MDA 活性均值 (× 10 ⁻⁵ nmol/mg protein/h)
空白对照	1	0.3594	7.8	22.5136	1.0	1.6
	2	0.2595	13.8	17.1500	2.4	1.6
	3	0.3229	9.6	22.9227	1.3	1.6
EO.05mM	1	0.3179	21.7	27.8300	2.3	2.3
	2	0.3053	21.7	23.8313	2.7	2.3
	3	0.3688	18.6	29.8773	1.9	2.3
EO.5 mM	1	0.3467	46.2	26.2409	5.6	5.5
	2	0.3220	50.2	28.6955	5.3	5.5
	3	0.2779	40.2	21.7409	5.5	5.5
NEO.05mM	1	0.3229	27.7	30.0136	2.8	3.3
	2	0.2736	24.9	20.1956	3.7	3.3
	3	0.2425	0*	15.5590	0*	3.3
NEO.5mM	1	0.2403	0*	15.4227	0*	9.2
	2	0.2420	40.2	13.3318	9.0	9.2
	3	0.2838	49.2	15.8318	9.3	9.2

注:表中*值未被采用

3 讨论

同其它研究过的脊椎动物一样,在鱼类中,将 T₄ 转化为有较强生物活性 T₃ 的主要途径是通过肝脏和肾脏等组织中的 5'-MDA 的作用完成的^[3]。

本实验结果是 NE 和 E 都对鲫鱼离体肝组织中的 5'-MDA 活性的提高有刺激作用,并且刺激作用的强弱与所加的 NE 和 E 的剂量有关,剂量越大,刺激作用越强,这点与虹鳟肝组织的 5'-MDA 活性随 NE 和 E 的浓度提高而增强是相同的,但外源激素 E、NE 在鱼类离体组织中的作用,鲫鱼 5'-MDA 活性与冷水性虹鳟^[5]相比也存在着较大的差异:①在鲫鱼中同剂量的 NE 对 5'-MDA 的作用强于 E 的作用,在虹鳟却相反;②NE、E 对虹鳟肝组织 5'-MDA 活性均有较强的作用,但二者之间差异不显著,NE、E 对鲫鱼亦均有较强作用,但二者之间差异显著。鲫鱼和虹鳟离体肝组织对 NE 和 E 反应存在差异,这可能与实验对象本身生活环境和隶属地位有关及机体的结构有关,虹鳟隶属鲑形目,冷水性鱼类,组织培养液 pH 值为 7.0,而鲫鱼隶属鲤形目,暖水性鱼类,血液 pH 值为 7.6,其组织培养液亦使用 7.6,且鲫鱼肝脏、胰脏弥散在一起,其测得的肝组织 5'-MDA 的活性实际上是肝胰脏的 5'-MDA 的活性。E 和 NE 二者的作用虽然相似,但前者在促进糖代谢和增强心脏作用方面更为显著,而后者在使外周血管收缩引起血压升高效应方面特为明显^[3],但同在离体肝组织中二者的作用为什么会产生差异,还值得深究。

Eales 等在对北极红点鲑作腹腔注射 NE 和 E 的实验中发现 1μg/g 鱼体重 E 对血液中的 T₄ 通过 5'-MDA 转化为有较强生物活性的 T₃ 没有影响,但血液中 T₄ 的含量在 E 注射后 2h 内有显著的增加,6h 后下降,24h 后恢复正常,这个过程是受甲状腺、垂体和下丘脑调控的,也就是说外源 NE 和 E 对鱼体产生的影响是暂时的^[6]。离体组织因不受整个机体内分泌系统的影响,机体不能进行调节,因而导致 NE 和 E 对鲫鱼及虹鳟离体肝组织中 5'-MDA 活性产生了明显的作用。

本文承蒙赵维信教授悉心指导, 特此致谢!

参考文献:

- [1] 孟庆闻, 缪学祖, 俞泰济, 等.《鱼类学》[M]. 上海: 上海科技出版社, 1987, 162-163.
- [2] Leatherland J F, Farbridge K J. Chronic fasting reduces the response of the thyroid to growth hormone and TSH and alters the growth hormone-related changes in hepatic activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. Gen Comp Endocrinol. 1992, 87: 342-353.
- [3] Byamungu N, Mol K, Kuhn E R. Evidence for the kidney as an important source of 5'-monodeiodination activity and stimulation by somatostatin in *Oreochromis niloticus* [J]. Gen Comp Endocrinol, 1992, 88: 199-208.
- [4] 李洪, 童寰量. 牙鲆的组织培养与鳃细胞系的获得[J]. 水产学报, 1997, 21(1): 193-196.
- [5] Brett S E, Bret, Leatherland J F. Epinephrine and norepinephrine elevate 5'-monodeiodinase activity in rainbow trout liver slices[J]. Fish phys and Bioch, 1997, 16(1): 29-34.
- [6] Ealws J G, Ranson M, Shostak S, et al. Effects of Catecholamins on plasma thyroid hormone levels in Arctic charr, *Salvelinus alpinus*[J]. Gen Comp Endocrinol, 1986, 63: 393-399.

欢迎订阅 2004 年《水产文摘》

《水产文摘》是我国水产行业外文文摘信息的权威检索刊物, 文摘信息源刊包括、美、英、荷兰、加拿大、日、法、德、俄、澳大利亚、印度、菲律宾、以色列、韩国等十多个国家的 140 多种核心期刊、论文汇编、专著等, 学科包括水产总论、渔业生物学、水产资源与捕捞技术、水产养殖、水产生物病害及防治、渔业生态环境及水产加工等栏目。年终编辑出版本年度主题索引。自 2004 年起本刊增设水产综述及文摘、世界水产信息等栏目, 以全面、及时报道世界各地渔业科研、生产的新技术、新成就、新水平和新动向。

《水产文摘》由中国水产科学研究院南海水产研究所主办, 1963 年创刊, 月刊, 每月 10 日出版, 国内外公开发行人, 邮发代号 46-65。每期定价 8.00 元, 全年 12 期 96.00 元(含邮费)。读者可到当地邮局订阅, 也可将款汇至《水产文摘》编辑部订阅或补订。

编辑部地址: 广州市新港西路 231 号, 邮编 510300

联系电话 (020) 84458694, 传真 (020) 84451442

E-mail: scwz@163.net