

大阪鲫卵黄蛋白原和钙离子 关系的初步研究

李朝军 刘荣臻 王浩 邓戎

(南京大学生物学系, 210008)

提 要 注射苯甲酸雌二醇诱导雄性大阪鲫产生雌性特异血清蛋白(卵黄蛋白原), 随着诱导天数的增加, 血清中的钙离子浓度升高, 同时血清中的卵黄蛋白原的含量也相应增加。在此过程中肝细胞的细胞质中存在大量的钙离子, 并进行着旺盛的蛋白合成。雌鱼和被诱导的雄鱼一样在肝细胞内也存在大量的钙离子。正常雄鱼的肝细胞不合成卵黄蛋白原, 只有很少的钙离子存在。腹腔注射氯化钙使卵母细胞的卵径增大(实验组为 $1.08 \pm 0.14\text{mm}$; 对照组为 $1.04 \pm 0.14\text{mm}$), 并使卵母细胞的蛋白含量升高, 同时卵泡膜上毛细血管的分布更为稠密, 这表明钙离子可促进卵母细胞的发育和蛋白的吸收。

关键词 大阪鲫, 钙离子, 卵黄蛋白原, 苯甲酸雌二醇, 肝细胞, 卵母细胞

卵黄蛋白原(vitellogenin)是存在于性成熟卵生动物血清中的一种糖脂磷蛋白, 它在雌激素的作用下, 于动物体的肝细胞内合成(无脊椎动物在肠, 脂肪体内合成), 经循环系统到达卵巢, 为卵母细胞吸收利用 [Bose 和 Raikhel, 1988; Follet 和 Redshaw, 1974; Tyler 等, 1988; Wallace, 1978]。在卵黄蛋白原发生过程中伴随着钙离子浓度的变化 [Aida 等, 1973; Elliot 等, 1979; Flett 和 Leatherland, 1989; Hori 等, 1979; Oguri 和 Takada, 1967; Whitehead 等, 1980]。鱼类的这种高钙效应一方面是由于卵黄蛋白原浓度的升高 [Aida 等, 1973; Whitehead 等, 1980], 另一方面也是由于血清中离子活性钙浓度的升高所致 [Hori 等, 1979]。

但是, 对于钙离子和卵黄蛋白原的进一步的关系却缺乏研究。本文以苯甲酸雌二醇诱导雄性大阪鲫产生卵黄蛋白原, 并研究在此过程中血清中的钙离子浓度的变化和肝细胞内钙离子的存在情况, 以探讨钙离子和性腺发育的关系。

一、材料与方 法

1. 实验鱼的采集 雄性和雌性大阪鲫, 体重 200 克左右, 购于农贸市场。实验前于水族箱内饲养 24 小时以上, 每日投饵。

2. 卵黄蛋白原的诱导 于雄鱼背部肌肉按 1mg/ml 的量注射苯甲酸雌二醇(上海第九制药厂, 2mg/ml), 每注射两天停一天, 共注射 17 针。

3. 血清中钙离子浓度的测定 每次注射后 4 小时, 以无离子水冲洗鱼体尾柄部, 吸

干后断尾取血,室温静置,凝血后 3000rpm 离心 10 分钟,得到血清。络合滴定法测定血清中钙离子的浓度;钙—羧酸指示剂作指示剂, EDTA. 2Na 作滴定剂,溶液颜色由酒红变为蓝色时为滴定终点。

4. 血清中卵黄蛋白原的检测 血清点样做聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳。分离胶浓度为 7%,浓缩胶浓度为 3.4%。考马斯蓝 G250 染色。

5. 肝细胞内钙离子的定位 采用焦锑酸钾沉淀钙离子的方法 [Suzuki 7. Sugi, 1978]显示肝细胞内钙离子的存在。取注射苯甲酸雌二醇 13 针雄鱼,雌鱼和正常雄鱼肝脏,固定、漂洗、脱水、包埋、聚合。前固定液含 90mMol 的草酸钾,后固定液含 2%的焦锑酸钾。LKB 超薄切片机切片,醋酸铀—柠檬酸铅双重染色, JEM-100S 透射电子显微镜观察。标本进行 X 射线微区分析颗粒钙离子的存在。

6. 腹腔注射氯化钙后卵径的测量 0.45M 氯化钙,以 200 毫克/千克体重的量于雌鱼胸鳍下凹窝内腹腔注射。每 24 小时注射一次,共注射 6 天。处死取卵。为避免不同卵巢部位的影响,分左右两侧卵巢,各前、中、后三个部位取卵。Olympus 显微镜游标尺测量,随机测量各 10 个卵的卵径,共测量 60 个卵,计算平均卵径,进行相差显著性分析。

7. 卵蛋白含量的测算 卵母细胞用浓硫酸于 150—160°C 的烘箱内消化后,微量克氏定氮-茚三酮法 [蔡武城、袁厚积,1982]测定卵母细胞的蛋白含量。

二、结 果

(一) 血清中钙离子浓度和卵黄蛋白原含量的变化

为了消除不同雌鱼个体由于性腺发育时期不同而产生的个体差异,本实验采用雄鱼

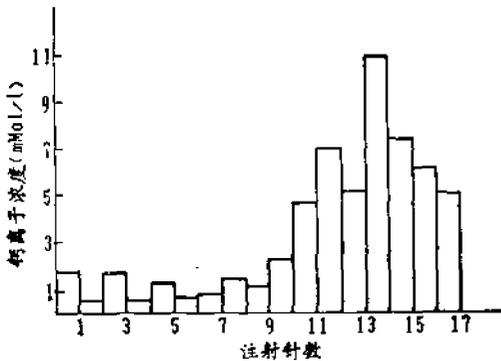


图 1 苯甲酸雌二醇诱导卵黄蛋白原产生时血清中的钙离子变化情况

Fig. 1 The change of calcium concentration in serum of fish injected with estradiol benzoate

做实验材料,因为雄鱼在雌激素的作用下也能产生卵黄蛋白原。在注射苯甲酸雌二醇的前几针,由于不同雄鱼个体对雌激素反应的敏感性不同,血清中钙离子的浓度有波动。在注射 14 针时钙离子浓度达到最高峰,以后钙离子浓度急剧下降(图1)。这可能是由于过量注射苯甲酸雌二醇引进机体伤害所致。这种异常生理状态超出雄鱼个体所能承受的程度,从而使个体代谢紊乱,甚至引起机体死亡。

注射苯甲酸雌二醇使血清中卵黄蛋白原的含量也呈升高趋势,达到顶峰12针后含量也下降。但卵黄蛋白原含量峰值的针数并不和钙离子相对应,图版-1。

(二) 肝细胞内钙离子的定位

大约注射苯甲酸雌二醇 12 针时血清中卵黄蛋白原的含量最高, 14 针时血清中钙离子的含量最高, 所以取注射 13 针时雄鱼的肝细胞进行钙离子的定位研究。图版-2、图版-3 显示注射 13 针苯甲酸雌二醇时肝细胞的粗面内质网和线粒体周围聚集大量的颗粒, 这些颗粒经 X 射线微区分析表明含有钙离子。同时, 内质网网池略显膨大, 有分枝交叉现象。而且肝细胞内线粒体和粗面内质网数量大量增加, 并大多集合于一处, 图版-4。这说明此时肝细胞内正进行着旺盛的蛋白质合成。III 期卵雌鱼的肝细胞的细胞质中也有许多含钙离子的颗粒, 颗粒密度和注射苯甲酸雌二醇时无明显差别, 只是内质网排列整齐, 网池未见膨大, 图版-5。

正常雄鱼肝细胞内线粒体和粗面内质网数量少, 无明显颗粒存在, 图版-6。说明雄鱼肝细胞蛋白质合成不旺盛。

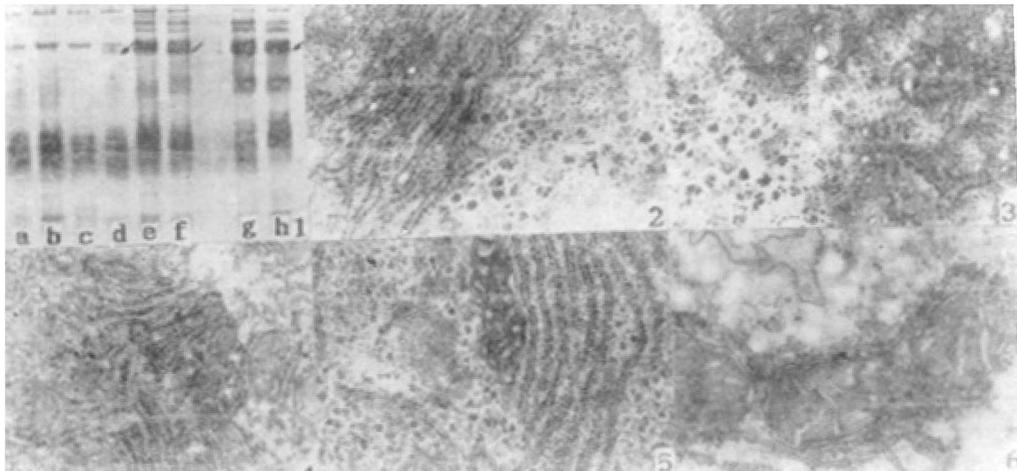


图 版 Plate

1. 注射苯甲酸雌二醇时血清中卵黄蛋白原的变化情况 (箭头: 卵黄蛋白原)。a. 2 针; b. 4 针; c. 6 针; d. 8 针; e. 10 针; f. 11 针; g. 12 针; h. 13 针。 2. 注射 13 针苯甲酸雌二醇时雄鱼肝细胞的钙离子颗粒及糖原颗粒 (箭头), 示膨胀分枝的粗面内质网, $\times 30,000$ 。 3. 注射 13 针苯甲酸雌二醇时雄鱼肝细胞线粒体和粗面内质网周围的钙离子颗粒, $\times 30,000$ 。 4. 注射 13 针苯甲酸雌二醇时雄鱼肝细胞内大量聚集的线粒体和粗面内质网, $\times 10,000$ 。 5. III 期卵雌鱼肝细胞线粒体和粗面内质网周围的颗粒, $\times 25,000$ 。 6. 雄鱼肝细胞的线粒体和粗面内质网, 周围有很少的颗粒。

(三) 卵径的测量和卵蛋白含量的测定

经测量, 实验组平均卵径为 $1.08 \pm 0.14\text{mm}$, 对照组为 $1.04 \pm 0.14\text{mm}$ 。经相差显著性分析, $t = 3.356 > t_{60, 0.05} (\text{双侧}) = 2.000$, 实验组和对照组存在显著性差异。即注射氯化钙促进了卵母细胞的生长。

在测量卵径的过程中观察到: 注射了氯化钙的大阪鲫卵母细胞的卵泡膜上毛细血管的分布密度大大超过未注射鱼的卵母细胞。注射氯化钙后毛细血管像网一样笼罩住卵母

细胞,对照组的卵泡膜上毛细血管的分布则很稀疏。这从另一个方面说明钙离子可能促进了卵母细胞的吸收功能,因为卵黄蛋白原是由血液从肝脏运送至卵巢为卵母细胞吸收利用的[Tyler等,1988;Wallace,1978],毛细血管分布的增加无疑对卵黄蛋白原的吸收大有益处。

经微量克氏定氮—茚三酮法测定,注射氯化钙后卵母细胞的蛋白含量为29.31%,对照组仅为14.60%。注射氯化钙使卵蛋白含量大为增加,这种增加可能是通过卵母细胞旺盛的蛋白吸收功能和/或卵母细胞自身合成能力的增强来实现的。

过量的腹腔注射氯化钙也会导致机体的死亡。

三、讨 论

1. 我们有关钙离子和卵黄蛋白原关系的工作是基于鱼类在性腺成熟过程中血清中的雌激素、卵黄蛋白原和钙离子规律性变化的现象。我们发现一定剂量范围内,苯甲酸雌二醇在诱导鱼体产生卵黄蛋白原的同时,也引起血清中钙离子浓度的升高。我们所测定的钙离子,实际上是血清中存在的离子性的钙,即可超滤的钙。但是霍尔,W.S等[林浩然等译,1987]认为雌激素只能使血清中不可超滤的结合于蛋白质的钙、磷和蛋白质含量升高,而不影响可超滤钙离子的含量。我们认为,生物体的体液中起一定生理功能的一般都是离子性的钙,结合于蛋白质上的钙离子只能作为一种存在,很少具备特定的功能,如刺激卵黄蛋白原的吸收等。在雌激素的过度刺激下,鱼体不得不动用体内的钙库—骨骼以供应卵黄蛋白原合成之需和其它功用[Budde,1958]。钙离子只能经循环系统才能够到达肝脏等效应器官,那么血清中的钙离子浓度就必然会出现升高的现象。

造成这种差别的原因可能是由于测定钙离子的方法不同。Fleming和Merei[1961]采用火焰分光光度法测量钙离子的浓度,这实际上包括了样品中离子性的钙和卵黄蛋白原结合的钙离子。而Hori等[1979]采用O-甲酚酞复合物显色的方法测定血清中的钙离子的浓度,和我们一样测定的是血清中的离子活性钙,也观察到钙离子升高的现象。

2. 许多研究者在研究雌激素、促性腺激素同卵黄蛋白原产生的关系的同时,虽然观察到在此过程中钙离子浓度的变化,但很少注意钙离子和性腺发育的关系。我们发现腹腔注射氯化钙使卵母细胞活动增加,特别是蛋白质吸收功能的增强。钙离子促进卵母细胞生长的原因可能有以下几点:①钙离子和某些激素相互配合,促进卵母细胞的生长。Campbell和Idler[1976]认为非糖蛋白促性腺激素具有促进性腺吸收卵黄蛋白原的功能。促性腺激素中,催乳激素不含糖类,为非糖蛋白促性腺激素,它在作用过程中并不影响腺苷酸环化酶的活性,即它不以cAMP为第二信使[杰弗理·佐贝著,曹敖鸣等译,1989],它可能是以钙离子为第二信使发挥生理功能。激素和受体结合后,细胞内钙离子的浓度升高,钙离子与钙调蛋白结合,刺激各种酶发生相应的生理反应。鱼类中促进性腺吸收卵黄蛋白原的非糖蛋白促性腺激素的作用机制可能和催乳激素相类似。促性腺激素通过刺激滤泡细胞产生孕酮促进卵母细胞的成熟,孕酮又通过钙—钙调蛋白复合物的作用促进卵母细胞的成熟[Maller和Krebs,1980;Wasserman和Smith,1981],钙—钙调蛋白复合物可以代替孕酮促进卵母细胞的成熟。另外钙离子的存在也有利于卵

母细胞膜和滤泡细胞膜上激素和受体的结合。所以细胞外存在充分的钙离子无疑有着积极的意义。②卵黄蛋白原一般是通过微胞饮的形式被摄入卵母细胞的。卵的滤泡细胞膜上存在卵黄蛋白原的受体 [Stifani 等, 1988], 卵黄蛋白原和受体结合后, 受体将卵黄蛋白原传入细胞内。而钙离子的存在对配体和受体复合物的形成、内吞小泡的形成均有促进作用。③钙离子对卵母细胞本身生理功能的影响。钙离子在蛋白激酶的作用过程中, 对底物的调整有重要作用 [Baghdassarian-chalage 等, 1988]。内吞小泡形成后在卵母细胞内的运送和微管、微丝系统有关, 钙离子也随之发挥作用。

3. 注射苯甲酸雌二醇促进雌鱼产生卵黄蛋白原时, 虽然雌鱼血清中卵黄蛋白原的浓度非常高, 但性腺发育状况并不好, 卵母细胞的蛋白吸收功能并不旺盛。高剂量的雌激素虽然刺激了卵黄蛋白原的产生, 也可能会反馈抑制促性腺激素的分泌, 从而使卵母细胞不能大量吸收血清中的卵黄蛋白原。Campbell 和 Idler [1976] 发现垂体抽提液中的非糖蛋白成分可以抵消雌二醇使垂体切除的美洲拟鲮血清中卵黄蛋白原升高的效应, 使性腺摄取卵黄蛋白原的活性增强。Ng 和 Idler [1978] 等的研究也证明了这一点。

4. 鱼类在性腺成熟大量合成卵黄蛋白原时, 一般伴随着肝细胞细胞结构的变化, 如粗面内质网增加、线粒体发达、胞质中糖原颗粒和脂滴消失等现象 [Hori 等, 1979; Peute 等, 1978; van Bohemen 等, 1981]。这是雌激素动员细胞内物质大量合成卵黄蛋白原的结果。注射苯甲酸雌二醇使大阪鲫肝细胞的胞质中存在大量的钙离子, 这些钙离子供给卵黄蛋白原合成之需, 因为卵黄蛋白原是一种结合钙的蛋白质 [Aida 等, 1973; Hori 等, 1979], 同时, 细胞内线粒体和粗面内质网聚集在一起, 以更好地为蛋白质合成提供能量。

参 考 文 献

- [1] 杰弗里, 佐贝(曹致鸣等译), 1989. 生物化学, 383—390. 复旦大学出版社(沪).
- [2] 蔡武城、袁厚积, 1982. 生物物质常用化学分析方法, 89—92. 科学出版社(京).
- [3] 霍尔, W. S. 等(林浩然等译), 1987. 鱼类生殖生理学—内分泌组织与激素, 295—315. 中山大学出版社(穗).
- [4] Aida, K. *et al.*, 1973. Physiological studies on gonadal maturation of fishes, 1. sexual difference in composition in plasma protein of ayu in relation to gonadal maturation. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **39**: 1091—1106.
- [5] Baghdassarian-chalage, D. *et al.*, 1988. Protein kinase and their endogenous substrates in the fat body of female *Rhocius prolixus*. *Insect. Biochem.*, **18**(5): 435—442.
- [6] Bose, S. G. and A. S. Raikhel, 1988. Mosquito vitellogenin subunits originate from a common precursor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **155**(1): 436—442.
- [7] Budde, M. L., 1958. The effect of parathyroid extract upon the teleost fish, *Labistes reticulatus*. *Growth.*, **22**: 73—92.
- [8] Campbell, C. M. and D. R. Idler, 1976. Hormonal control of vitellogenesis in hypophysectomized winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaum). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **28**: 143—150.
- [9] Elliot, J. A. K. *et al.*, 1979. Effect of Estradiol-17 β on serum calcium and vitellogenin levels in rainbow trout. *J. Endocrinol.*, **83**: 54—55.
- [10] Flett, P. A. and J. F. Leatherland, 1989. Dose-related effects of 17 β -estradiol (E₂) on liver weight, plasma E₂, protein, calcium and thyroid hormone levels, and measurement of the binding of thyroid hormones to vitellogenin in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Reichidson. *J. Fish Biol.*, **34**: 515—527.

- [11] Fleming, W. R. and A. H. Merel, 1961. The effect of mammalian parathormone on the serum calcium levels of *Fundulus kansae* and *Fundulus catenatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 2: 1—7.
- [12] Follet, B. K. and Redshaw, M. R., 1974. The physiology of vitellogenesis. In: *Physiology of Amphibia* (B. Lofts ed), 2: 219—307. Academic Press. New York.
- [13] Hori, S. H. *et al.*, 1979. Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgens. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 37: 306—320.
- [14] Maller, J. L. and E. C. Krebs, 1980. Regulation of oocyte maturation. *Curr. Top. Cell Regul.*, 16: 271—371.
- [15] Ng, T. B. and D. R. Idler, 1978. A vitellogenin hormone with a large and small gorm salmon pituitaries. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 35: 189—195.
- [16] Oguri, M. and N. Takada, 1967. Serum calcium and magnesium levels of goldfish, with special reference to the gonadal maturation. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 33: 161—166.
- [17] Peute, J. *et al.*, 1978. Ultrastructure and lipid content of liver of the zabrafish, *Brachydanio*, related to vitellogenin synthesis. *Cell Tissue Res.*, 186: 297—308.
- [18] Stifani, S. *et al.*, 1988. Solubilization and characterization of the chicken oocyte vitellogenin receptor. *Biochem. J.*, 250: 467—475.
- [19] Suzuki, S. and H. Sugi, 1978. Ultrastructural and physiological studies on the longitudinal body wall muscle of *Dolabella auricularia* II. localization of intracellular calcium and its translocation during mechanical activity. *J. Cell Biol.*, 79: 467—478.
- [20] Tyler C. R. *et al.*, 1988. In vivo ovarian uptake and processing of vitellogenin in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Exp. Zool.*, 246: 171—179.
- [21] van Bohemen, C.G. *et al.*, 1981. Annual changes in plasma and liver in relation to vitellogenesis in the female rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 44: 94—107.
- [22] Wallace, R. A., 1978. Oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In: *The Vertebrate Ovary* (R. A. Jones ed), 405—501. Plenum, New York.
- [23] Wasserman, W. J. and L. D. Smith, 1981. Calmodulin triggers the resumption of meiosis in amphibian oocytes. *J. Cell Biol.*, 89: 389—394.
- [24] Whitehead, C. *et al.*, 1980. Estradiol-17 β , calcium and vitellogenin interrelation during accelerated and biannual spawnings in the rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 40: 329—330.

THE INITIAL STUDY ON THE RELATIONSHIP BETWEEN VITELLOGENIN AND CALCIUM ION IN *CARASSIUS AURATUS CUVIERI*

Li Chaojun, Liu Rongzhen, Wang Hao and Deng Rong

(Department of Biology, Nanjing University, 210008)

ABSTRACT Administration of massive doses of estradiol benzoate into male fish caused an increase of vitellogenin and calcium levels in serum and proliferation of rough endoplasmic reticulum and mitochondria in liver cells. Meanwhile, a lot of calcium presented in liver cell's cytoplasm. There was also calcium in the liver cell of naturally matured female fish. But the liver cells of the male fish without injection of estradiol benzoate had few calcium. This suggested that calcium had some effects on the synthesis of vitellogenin. The injection intraperitoneally with calcium chloride caused the expansion of egg's diameter and increa-

se of protein content in oocytes. When the female fish was injected with calcium chloride, the diameter of oocytes was $1.08 \pm 0.14 \text{mm}$ ($n = 60$) and the protein content was 29.14%. As to the control, the relevant data were $1.04 \pm 0.14 \text{mm}$ ($n = 60$) and 14.60%. The capillary on follicular membrane with calcium chloride was denser than control. This indicated that calcium could enhance the growth of oocytes and the absorption of protein, especially vitellogenin.

KEYWORDS *Carassius auratus cuvieri*, calcium, vitellogenin, estradiol benzoate, liver cell, oocyte

1994年度《中国水产文摘》征订

本刊系我国水产系统唯一的一本全面报道国内水产科技文献的综合性检索期刊,由中国水产科学研究院情报所主办。其宗旨是全面、及时地报道全国各地以各种形式出版的水产科技文献,为读者快速、方便地检索国内水产科技文献服务。

本刊所收录的文献类型有期刊、专著、汇编、会议录、科技报告、技术标准等。按以下主要类目编排:(1)水产总论;(2)水产基础科学;(3)水产资源和环境保护;(4)水产捕捞;(5)海水养殖;(6)淡水养殖;(7)水产生物病害及防治;(8)饲料和肥料;(9)水产品保鲜及加工;(10)渔业机械仪器和渔船;(11)渔业经济。年报道量约3000条。每年第一期刊登本刊引用主要期刊一览表,年终编辑出版本年度主题索引、著者索引。

本刊为双月刊,逢双月底出版,国内外公开发行。每期定价8.00元,全年六期共48.00元。邮发代号18—126。请广大老订户和新读者及时到当地邮局办理订阅手续。

编辑部地址:北京市永定路南青塔村150号; 邮政编码:100039。