

镉对鲤血清促性腺激素和生长激素的影响

马广智

(华南师范大学生物学系, 广州 510631)

林浩然 张为民

(中山大学生物学系, 广州 510275)

摘 要 采用 CdCl_2 浸没法处理鲤, 研究镉对鲤血清促性腺激素(GtH)和生长激素(GH)水平的影响。结果表明: 较高浓度镉(CdCl_2 9 mg/L)处理引起血清 GtH 水平降低, GH 水平升高; 提高水中钙浓度, 能使由镉引起的 GtH 水平的降低恢复到正常水平, 并对镉引起的 GH 水平升高起延迟作用; 镉处理使鲤对 LHRH-A 刺激 GtH 分泌的反应性下降, 提高水中钙浓度也不能恢复正常。实验结果提示: 镉引起的 GtH 和 GH 的变化可能主要是镉干扰了钙的生理作用。

关键词 镉, 鲤, 促性腺激素, 生长激素

水中镉污染毒害鱼类, 引起低血钙是镉毒害鱼类的特点之一[Muramoto, 1981; Larsson 等, 1981]。鱼类促性腺激素(gonadotropin, GtH)和生长激素(Growth hormone, GH)是调控鱼类生理活动的重要激素, 并且其分泌活动是钙依赖性的[Mikolajczyk, 1990; 林信伟和林浩然, 1993]。本实验采用 CdCl_2 浸没法处理鲤鱼, 通过测定血清 GtH 和 GH 水平的变化, 研究水中的镉对鲤鱼 GtH 和 GH 分泌的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验鱼及其驯养

鲤鱼(*Cyprinus carpio* L.)购自广州市农贸市场, 雄性, 性腺成熟系数约为4.2—6.1%, 体重250—280 g。实验前在室温和自然光周期下饲养于室内水族箱中。

1.2 染毒与取样

把 CdCl_2 (A. R.) 直接溶于水族箱, 采用浸没的方式对鲤鱼进行镉处理。用 CaCl_2 (A. R.) 提高水中钙浓度。实验鲤鱼停止喂食, 实验分为五个组, 即0.3 mg/L CdCl_2 处理组、9 mg/L CdCl_2 处理组、111 mg/L CaCl_2 处理组、9 mg/L CdCl_2 加111 mg/L CaCl_2 混合处理组和对照组。每组8条鱼, 分别放入五个水族箱后, 用气泵不断充气, 实验期间水温约为25 C。

在实验开始后的第4、8和12天的上午8时, 对每组鲤鱼穿刺尾部血管分别采血一次。在第14

天,给每组鲤鱼注射 LHRH-A(0.04 mg/kg 体重),4小时后分别采血样。LHRH-A(Ala⁶ Pro⁹ NEt-LHRH)购自宁波市激素制品厂,用 VEH(0.7%NaCl 和0.1%偏重亚硫酸钠的混合液)配制。血样凝固后离心收集血清,保存在-28 C 用于测定 GtH 和 GH。

1.3 激素测定和数据分析

GtH 和 GH 均采用放射免疫测定方法测定[Peter,1984b;Marchant 等,1989]。数据以平均值±标准差表示。实验组与对照组血清 GtH 或 GH 水平的差异采用 t 检验。当 P<0.05,认为差异显著,用星号“*”标出;当 P<0.01,认为差异极为显著,用双星号“**”标出。

2 结果

2.1 镉对鲤血清 GtH 水平的影响

由图1,较低浓度镉处理组(0.3 mg/L CdCl₂)鲤鱼在实验的第4、8和12天,血清 GtH 水平与相对应的对照组相比均无显著差异;较高浓度镉处理组(9 mg/L CdCl₂)鲤鱼在实验的第4和8天,血清 GtH 水平与相对应的对照组相比无显著差异,但在第12天血清 GtH 水平(1.82±0.58 ng/ml)显著低于相应的对照组鲤鱼血清 GtH 水平(3.50±0.78ng/ml)(P<0.01)。

在实验的第14天,镉处理组和对照组鲤鱼注射 LHRH-A 后4小时血清 GtH 水平如图2。低浓度镉处理组(0.3 mg/L CdCl₂)和高浓度镉处理组(9 mg/L CdCl₂) 鲤鱼血清 GtH 水平均显

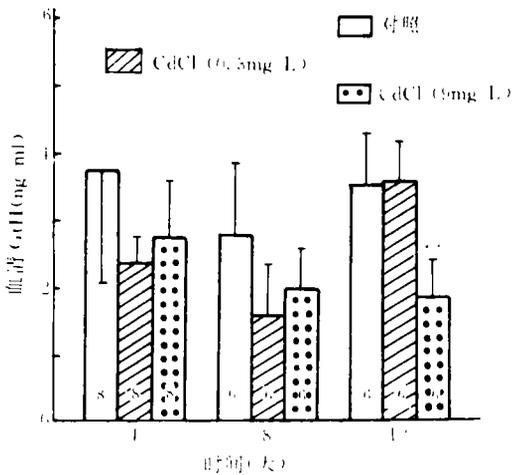


图1 用 CdCl₂浸没处理4、8和12天,对鲤血清 GtH 水平的影响

Fig. 1 Effects of immersion treatment with CdCl₂ for 4,8,12 days on serum GtH level of common carp

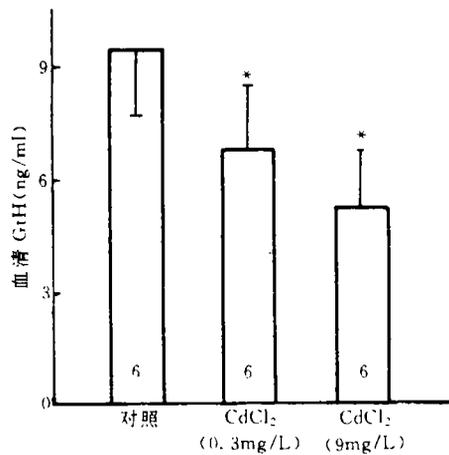


图2 用 CdCl₂浸没处理14天,注射 LHRH-A 后4 小时鲤血清 GtH 水平

Fig. 2 Immersion treatment with CdCl₂ for 14 days, serum GtH level of common carp at 4 hrs postinjection with LHRH-A

著低于对照组(0.3 mg/L CdCl₂组为6.81±1.72ng/ml, 9 mg/L CdCl₂组为5.43±1.35ng/ml, 对照组为9.79±2.88ng/mg)(P<0.05)。

将CaCl₂溶于水中以增加钙浓度,对鲤鱼血清GtH水平的影响和对镉作用的影响结果如图3。单纯的钙处理组(111 mg/L CaCl₂)鲤鱼在实验第4、8、和12天,血清GtH水平与相对应的对照组相比均无显著差异;单纯的镉处理(9 mg/L CdCl₂)鲤鱼在实验的第4和第8天,血清GtH水平与相对应的对照组相比无显著差异,在第12天血清GtH水平显著低于相对应的对照组;镉和钙混合处理组(9 mg/L CdCl₂+111 mg/L CaCl₂, Mol. Cd²⁺:Ca²⁺=1:20)鲤鱼在实验的第4天,血清GtH水平显著低于相对应的对照组,第8和12天,血清GtH水平与相对应的对照组在同一水平。

在实验的第14天,镉处理组、钙处理组、镉和钙混合处理组和对照组鲤鱼注射(LHRH-A)后4小时血清GtH水平如图4。钙处理组(111 mg/L CaCl₂)鲤鱼血清GtH水平与对照组相比无显著差异;镉处理组(9 mg/L CdCl₂)、镉和钙混合处理组(9 mg/L CdCl₂+111 mg/L CaCl₂)鲤鱼血清GtH水平均显著低于对照组。

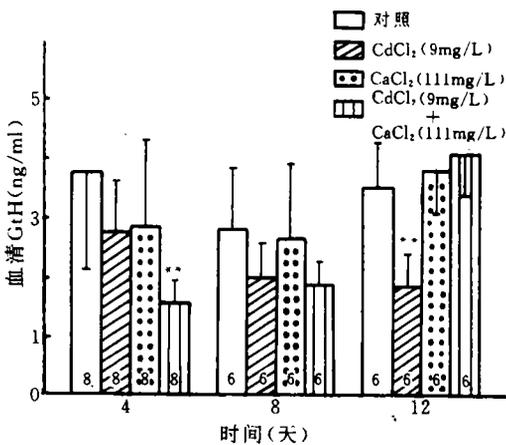


图3 用CdCl₂,CaCl₂,CdCl₂+CaCl₂浸没处理4、8和12天,对鲤血清GtH水平的影响

Fig. 3 Effects of immersion treatment with CdCl₂,CaCl₂,CdCl₂+CaCl₂ for 4,8,12 days on serum GtH level of common carp

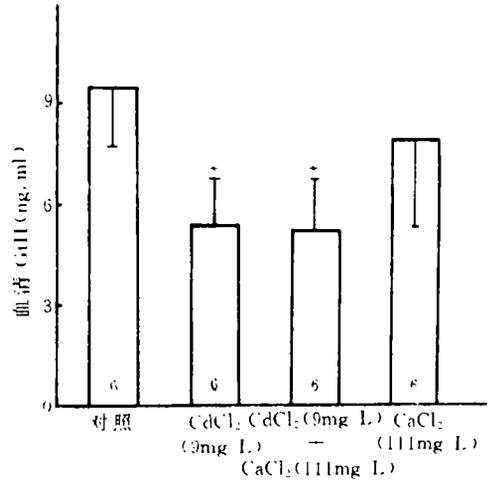


图4 用CdCl₂,CaCl₂,CdCl₂+CaCl₂浸没处理14天,注射LHRH-A后4小时鲤血清GtH水平

Fig. 4 Immersion treatment with CdCl₂,CaCl₂,CdCl₂+CaCl₂ for 14 days, serum GtH level of common carp at 4 hrs postinjection with LHRH-4

2.2 镉对鲤血清GH水平的影响

由图5,较低浓度镉处理组(0.3 mg/L CdCl₂)鲤鱼在实验的第4、8和12天,血清GH水平与相对应的对照组相比均无显著差异;较高浓度镉处理组(9 mg/L CdCl₂)鲤鱼在实验第4天,血清GH水平与相对应的对照组相比无显著差异,但在第8和12天血清GH水平极显著高于相对应的对照组(170.4±54.3比90.2±14.6ng/ml, 147.1±47.5比86.4±11.4ng/ml)(P<0.01)。

将 CaCl_2 溶于水中以增加钙浓度, 对鲤鱼血清 GH 水平的影响和对镉作用的影响结果如图6。单纯的钙处理组(111 mg/L CaCl_2) 鲤鱼在实验的第4和8天, 血清 GH 水平与相对应的对照组相比均无显著差异, 但在第12天血清 GH 水平显著高于相对应的对照组(108.8 ± 16.9 比 86.4 ± 11.4 ng/ml) ($P < 0.05$); 单纯的镉处理组(9 mg/L CdCl_2) 鲤鱼在实验的第4天, 血清 GH 水平与相对应的对照组相比无显著差异, 但在第8和12天血清 GH 水平极显著高于相对应的对照组; 镉和钙混合处理组(9 mg/L CdCl_2 + 111 mg/L CaCl_2) 鲤鱼在实验的第4和8天, 血清 GH 水平与相对应的对照组在同等水平, 但在第12天血清 GH 水平极显著高于相对应的对照组(135.4 ± 30.5 比 86.4 ± 11.4 ng/ml) ($P < 0.01$)。

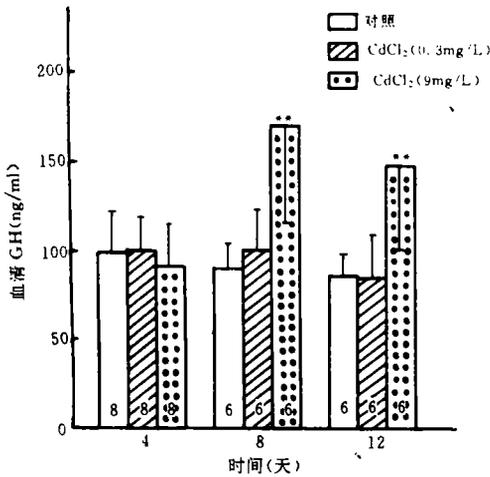


图5 用 CdCl_2 浸没处理4、8和12天, 对鲤血清 GH 水平的影响

Fig. 5 Effects of immersion treatment with CdCl_2 for 4, 8, 12 days on serum GH level of common carp

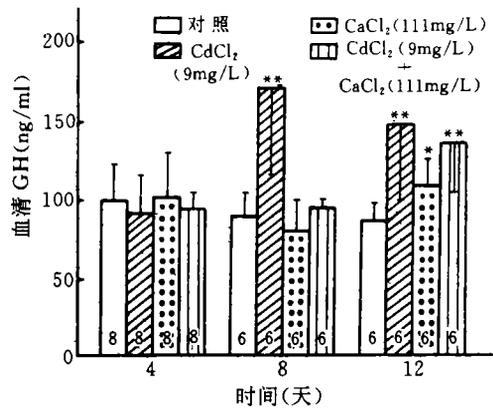


图6 用 CdCl_2 , CaCl_2 , CdCl_2 + CaCl_2 浸没处理4、8和12天, 对鲤血清 GH 水平的影响

Fig. 6 Effects of immersion treatment with CdCl_2 , CaCl_2 , CdCl_2 + CaCl_2 for 4, 8, 12 days on serum GH level of common carp

3 讨论

实验结果显示, 镉浸没处理鲤鱼引起血清 GtH 水平的变化与引起血清 GH 水平的变化规律明显不同, 但都与镉处理浓度和处理时间以及水体钙浓度有一定关系。

较高浓度镉处理组(9 mg/L CdCl_2) 鲤鱼在实验的第12天, 血清 GtH 水平显著低于相对应的对照组; 镉和钙混合处理组(9 mg/L CdCl_2 + 111 mg/L CaCl_2 , Mol. $\text{Cd}^{2+} : \text{Ca}^{2+} = 1 : 20$) 鲤鱼在实验的第4天血清 GtH 水平显著低于相对应的对照组, 但在第8和12天, 血清 GtH 水平与相对应的对照组在同等水平(如图3), 虽然还不清楚镉和钙混合处理组鲤鱼在实验的第4天血清 GtH 水平下降的原因, 但血清 GtH 水平总的变化趋势是由较低水平恢复到正常水平。在实验的第12天血清 GtH 水平与相对应的对照组在同等水平, 这与单纯的镉处理(9 mg/L CdCl_2 , 12

天)显然是不同的,说明镉处理引起的血清 GtH 水平的降低与钙有一定的关系,提高水中钙浓度有助于因镉处理引起的血清 GtH 水平的降低恢复到正常水平。

较低浓度镉处理(0.3 mg/L CdCl₂)和较高浓度镉处理(9 mg/L CdCl₂)均导致鲤鱼对 LHRH-A 刺激 GtH 分泌的反应性显然低于对照组(如图2),说明镉对 LHRH-A 刺激鲤鱼的 GtH 分泌有较强的抑制作用。镉和钙混合处理组(9mg/L CdCl₂+111mg/L CaCl₂, Mol. Cd²⁺: Ca²⁺=1:20)鲤鱼对 LHRH-A 刺激 GtH 分泌反应性低于对照组(如图4),说明钙对于消除镉抑制 LHRH-A 刺激鲤鱼 GtH 分泌的作用较小。

鱼类血清 GtH 水平主要是由脑垂体中 GtH 细胞不断分泌 GtH 维持的。GtH 细胞分泌 GtH, 主要受下丘脑的神经分泌细胞分泌促性腺激素释放激素(GnRH)和促性腺激素释放抑制因子(GRIF)如多巴胺(DA)的调控[Chang 等, 1984a; Peter, 1986]。GnRH 刺激 GtH 细胞分泌 GtH 的机制是, GnRH 与 GtH 细胞膜的受体结合, 激活钙离子通道, 增加细胞外钙内流[Chang 等, 1986; Jamaluddin 等, 1989]; GnRH 也可以动员细胞内钙贮存库释放 Ca²⁺ 增加细胞质钙的浓度[Chang 等, 1987 a]; 在哺乳动物已经确认 GnRH 是通过钙作为第二信使而发挥刺激 GtH 细胞分泌 GtH 作用的[Conn 等, 1987; Huckle and Conn, 1988]。已经有许多报道, 在鱼类中 GnRH 刺激 GtH 细胞分泌 GtH 是一个钙依赖性的过程[Jamaluddin 等, 1989; Levavi-Sivan and Yaron, 1989; Mikolajczyk 等, 1990]。LHRH-A 类似于 GnRH 的作用, 可刺激 GtH 细胞分泌 GtH。

镉可以引起鱼血钙降低[Verboost, 1989], 镉干扰细胞外钙通过钙通道内流[Hinkle 等, 1987]。因此, 镉处理引起鲤鱼血清 GtH 水平下降和对 LHRH-A 的反应性降低原因可能是, 镉处理引起鲤鱼血钙降低和干扰了脑垂体 GtH 细胞外钙通过钙通道内流, 进而干扰和抑制了 GnRH 或 LHRH-A 的作用, 使 GtH 分泌减少, 血清 GtH 水平下降。

镉处理引起鲤鱼血清 GH 水平的变化特点与引起 GtH 水平的变化特点相反, 较高浓度镉处理引起鲤鱼 GH 水平升高(图5)。提高水中钙离子浓度, 可延迟镉引起鲤鱼血清 GH 水平的升高。在实验的第8天, 单纯的镉处理组(9 mg/L CdCl₂)鲤鱼血清 GH 水平极显著地升高, 而镉钙混合处理组(9 mg/L CdCl₂+111 mg/L CaCl₂)鲤鱼血清 GH 水平没有升高, 保持正常水平; 直到实验的第12天, 镉钙混合处理组鲤鱼才和单纯镉处理组鲤鱼一样, 血清 GH 水平极显著高于对照组(图6)。实验结果提示, 镉引起鲤鱼血清 GH 水平的升高可能与钙有一定的关系。林信伟、林浩然等[1993]用离体的鲤鱼脑垂体实验结果表明, 脑垂体分泌 GH 是细胞外钙依赖性的: 显然, 镉浸没处理鲤鱼引起的低血钙是不利于脑垂体分泌 GH 的, 似乎镉处理应引起鱼的血清 GH 下降。而本实验结果为镉处理引起鲤鱼血清 GH 水平显著升高。这可能是在鱼类中 GH 参与离子平衡调节是其一个很重要的功能(Tatsuya 等, 1992), 镉引起鱼血钙降低, 血钙降低可能激活了调控 GH 分泌的脑部神经核团, 进而刺激脑垂体分泌 GH, 这种刺激 GH 分泌作用非常之强, 表现出脑垂体分泌 GH 增加, 血清 GH 水平显著升高, 以适应鱼体进行离子平衡调节的需要。提高水中钙浓度在一定的时间内可能有利于增加鳃吸收钙离子抵御镉引起鱼血钙降低, 但随着时间的延长, 水中增加的钙离子可能又造成鱼体离子平衡失调, 这可能就是提高水中钙离子浓度延迟镉引起的鲤鱼血清 GH 水平的升高和不能阻止 GH 水平升高的主要原

(1) Tatsuya S. *et al.*, 1992. Mode of action of growth hormone in salmonid osmoregulation; mediation by insulin-like growth factor. Second International Symposium on Fish Endocrinology, 1992.

因。

总之,水中镉对鲤鱼分泌 GtH 和 GH 的毒害影响是比较严重的。镉的毒害机理可能与钙有关,通过提高水中钙的浓度仅能有限地缓解镉的毒害作用。镉对鲤鱼分泌 GtH 和 GH 的详细毒害机制和有效的解毒方法还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 林信伟、林浩然,1993. 细胞外 Ca^{2+} 和 K^+ 对鲤鱼脑垂体离体生长激素分泌影响. 水产学报, **17**(1):7-13.
- [2] Chang, J. P. *et al.*, 1984. Effects of dopamine and norepinephrine on in vitro spontaneous and gonadotropin-releasing hormone-induced gonadotropin release by dispersed cells or fragments of the goldfish pituitary. *J. Life Sci.*, **35**:2027.
- [3] ——, 1986. Participation of voltage dependent calcium channels in the action of gonadotropin-releasing hormone. *J. Biol. Chem.*, **261**:9105.
- [4] ——, 1987. Mechanisms of GnRH action: Interactions between GnRH-stimulated calcium phospholipid pathways mediating gonadotropin secretion. In: *Endocrinology and physiology of reproduction* (P. C. K. Leung *et al.*), Plenum Press, New York. p. 135.
- [5] Conn, P. M. *et al.*, 1987. The molecular basis of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action in the pituitary gonadotrope. *Biol. Reprod.*, **36**:17-35.
- [6] Hinkle, P. M. *et al.*, 1987. Cadmium uptake and toxicity via voltage sensitive calcium channels. *J. Biol. Chem.*, **262**:16333-16337.
- [7] Huckle, W. R. and P. M. Conn, 1988. Molecular mechanism of gonadotropin-releasing hormone action. I. The effector system. *Endocr. Rev.*, **9**:387-395.
- [8] Jamaluddin M. D. *et al.*, 1989. Requirement of extracellular calcium in fish pituitary gonadotropin release by gonadotropin hormone-releasing hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **4**:190-198.
- [9] Larsson, A. *et al.*, 1981. Disturbed ion balance in flounder, *Platichthys flesus* L. exposed to sublethal levels of cadmium. *Aquat. Toxicol.*, **1**:19-36.
- [10] Levavi-Sivan B and Yaron Z., 1989. Gonadotropin secretion from perfused tilapia pituitary in relation to gonadotropin-releasing hormone. extracellular calcium and activation of protein Kinase C. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **75**:187-194.
- [11] Marchant, T. A. and R. E. Peter, 1989. Hypothalamic peptides influencing growth hormone secretion in the goldfish. *Endocrinology*, **124**:2509.
- [12] Mikolajczyk, T. *et al.*, 1990. Involvement of voltage-dependent calcium channels (VDCC) in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) comparison with K^+ action. *Reprod. Nutr. Dev.*, **30**:619-628.
- [13] Muramoto, S., 1981. Vertebral column damage and decrease of calcium concentrations in fish exposed experimentally to cadmium. *Environ. Pollut.*, **24**:125-133.
- [14] Peter, R. E. *et al.*, 1984. Gonadotropin release from the pars distalis of goldfish, *Carassius auratus*, transplanted beside the brain or into brain ventricle; additional evidence for gonadotropin-release-inhibitory factor. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **55**:337.
- [15] ——, 1986. Interaction of catecholamines and GnRH in regulation of gonadotropin secretion in teleost fish. *Recent. Prog. Horm. Res.*, **42**:513.
- [16] Verboost, P. M. *et al.*, 1989. The movement of cadmium through freshwater trout branchial epithelium and its interference with calcium transport. *J. Exp. Biol.*, **145**:185-197.

EFFECTS OF CADMIUM ON SERUM GONADOTROPIN AND GROWTH HORMONE IN COMMON CARP (*CYPRINUS CARPIO L.*)

Ma Guangzhi

(Department of Biology, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Lin Haoran and Zhang Weimin

(Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

ABSTRACT Effects of Cd^{2+} on serum gonadotropin (GtH) and growth hormone (GH) levels of common carp (*Cyprinus carpio L.*) by immersion treatment with CdCl_2 were studied. Being treated with the high concentration of CdCl_2 (9mg/L) for 12 days, the GtH level was significantly lower than that of the control (1.82 ± 0.58 VS 3.50 ± 0.78 ng/ml) ($P < 0.01$). Being exposed to CdCl_2 (9mg/L) for 8 or 12 days, the GH levels were significantly higher than that of the corresponding controls (170.4 ± 54.3 VS 90.2 ± 14.6 ng/ml or 147.1 ± 47.5 VS 86.4 ± 11.4 ng/ml) ($P < 0.01$). Being treated with cadmium plus calcium (CdCl_2 9mg/L + CaCl_2 111mg/L, Mol. $\text{Cd}^{2+} : \text{Ca} = 1:20$) for 8 days, the GH level of the fish was not significantly different than that of the control (95.3 ± 5.3 VS 90.2 ± 14.6 ng/ml) ($P > 0.05$), but for 12 days, the GH level was significantly higher than that of the control (135.4 ± 30.0 VS 86.4 ± 11.4 ng/ml) ($P < 0.01$), and the GtH level was not significantly different than that of the control (4.05 ± 0.71 VS 3.50 ± 0.78 ng/ml) ($P > 0.05$). Therefore, the lowering of GtH level caused by the CdCl_2 can be restored, the raising process of GH level caused by the CdCl_2 can be delayed by increasing water Ca^{2+} concentration.

Being treated with the low concentration (0.3mg/L), the high concentration (9mg/L) of CdCl_2 and CdCl_2 (9mg/L) plus CaCl_2 (111mg/L) for 14 days, the LHRH-A-stimulated GtH secretion were significantly lower than that of control ($P < 0.05$) in common carp. The results suggest that toxic effects of cadmium on GtH and GH secretion might be Cd^{2+} disturbed Ca^{2+} action.

KEYWORDS cadmium, common carp, gonadotropin, growth hormone