



## 促卵泡激素对牙鲆尾部神经分泌系统活动的影响

江鹏鑫<sup>1,2</sup>, 潘歆蓓<sup>1,2</sup>, 吕为群<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

3. 上海海洋大学, 海洋生物科学国际联合研究中心(中国科学技术部), 上海 201306)

**摘要:** 为探究促卵泡激素(FSH)是否参与调控鱼类特有的尾部神经分泌系统(CNSS)活动, 实验利用电生理技术检测FSH是否影响dahlgren细胞放电活动。此外, 利用PCR技术检测离体的CNSS在FSH急性灌流后和繁殖季节CNSS主要的相关基因的表达。结果显示, FSH促进dahlgren细胞放电频率和诱导部分细胞静止型放电转向爆发型放电。促卵泡激素受体结合抑制剂(FRBI-8)能够阻断FSH对dahlgren细胞放电活动的影响。FSH灌流后, CNSS中FSH受体基因(*fshr*)的表达量无显著变化, 而L型电压门控钙离子通道基因(*L-Ca<sup>2+</sup>*)的表达量显著上调。在繁殖季节, 脑垂体中*fshβ*的表达量和性腺指数(GSI)或CNSS中的尾加压素II基因(*U<sub>II</sub>*)的表达量呈显著的正相关。本研究首次证明FSH能够调控CNSS, 这为进一步解析CNSS在生殖和季节适应中的作用奠定基础。

**关键词:** 牙鲆; 尾部神经分泌系统; 神经调节; 促卵泡激素; 尾加压素II

**中图分类号:** Q 786; S 917.4

**文献标志码:** A

在脊椎动物中, 繁殖发育主要由下丘脑-脑垂体-性腺轴(HPG)调控。当外界环境条件刺激感觉器官时, 它可将应激信号传递至下丘脑并使下丘脑分泌促性腺激素释放激素(GnRH)等生物分子。来自下丘脑的GnRH刺激脑垂体释放促性腺激素(GtH), GtH通过血液循环运送至性腺组织调控性类固醇激素如雌二醇(E2)的合成和分泌, 最终调控鱼类生殖活动<sup>[1]</sup>。GtH在控制鱼类性腺发育并维持生殖功能稳定中起核心作用。一般认为2种促性腺激素(促卵泡激素FSH和促黄体激素LH)的功能不同, FSH的主要作用是诱导性腺发育、促进性类固醇合成与分泌以及配子的形成, 而LH则在促进配子的最后成熟以及排精排卵中起重要作用<sup>[1-2]</sup>。

控制水产动物繁殖过程并在人工养殖中获得高质量的卵子是水产养殖业可持续发展的重要前提之一<sup>[2]</sup>。然而, 在人工养殖环境中鱼类容易遭受各类慢性或急性应激, 从而影响鱼类的繁殖成功率<sup>[3]</sup>。与哺乳动物类似, 鱼类应激主要受下丘脑-脑垂体-肾间腺体轴(HPI)调控。下丘脑释放的促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)刺激脑垂体释放肾上腺皮质激素(ACTH), ACTH通过血液循环运送至肾间组织调控皮质醇(cortisol)的合成和分泌, 最终调控鱼类应激反应<sup>[4]</sup>。

鱼类还具有一套特殊的神经内分泌调控系统, 即尾部神经分泌系统(CNSS), 由大型神经内分泌细胞(dahlgren细胞)、神经轴突和尾垂体(urophysis)组成。它是血液中CRH、尾加压素I(U<sub>I</sub>)

收稿日期: 2021-02-21 修回日期: 2021-04-26

资助项目: 国家自然科学基金(31572599, 41376134)

第一作者: 江鹏鑫(照片), 从事鱼类行为和神经内分泌研究, E-mail: 15653887716@163.com

通信作者: 吕为群, 从事适应生物学研究, E-mail: wqlv@shou.edu.cn



和尾加压素 II (U II) 的主要分泌器官, 在鱼类应激反应、营养及渗透压调节中具有重要作用<sup>[5-6]</sup>。dahlgren 细胞体积大, 形状无规则或纺锤形, 细胞核大且多呈多核现象, 根据细胞直径可分为大、中和小细胞<sup>[5-6]</sup>。此外, Chen 等<sup>[7]</sup>在鲫 (*Carassius auratus*) 的研究中表明, dahlgren 细胞其细胞计量学、形态计量学、显微和亚显微结构、酶计量学和蛋白质含量计量学的季节变化均与卵巢发育呈现平行关系。Lu 等<sup>[8]</sup>在对欧洲川鲈 (*Platichthys flesus*) 的研究中发现, 血浆中 U II、钙离子浓度和 CNS 中 L 型电压门控钙离子通道基因 (*L-Ca<sup>2+</sup>*)、*crh*、*UI* 和 *U II* 的表达量与性腺指数 (gonadosomatic index, GSI) 呈现平行关系。同时, 徐根兴等<sup>[9]</sup>发现, GnRH 类似物 (LRH-A) 能够增强团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) CNS 中单胺荧光强度和促进尾垂体中内含物的释放。Marley 等<sup>[10]</sup>发现, 脑垂体分泌的催乳素能够影响欧洲川鲈 dahlgren 细胞放电活动, 进而可能提高 CNS 中荷尔蒙的释放水平。这些结果暗示着鱼类尾部神经内分泌系统与繁殖存在着密切联系。然而, 至今尚无报道 GtH 是否调控 CNS 活动。

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 是广盐性底栖鱼类, 具有发达的 CNS。Yuan 等<sup>[11-12]</sup>发现, CNS 不仅参与渗透压调节, 还参与热应激调节, 这对于溯河生殖洄游的鱼类具有重要的意义。牙鲆的性别决定是由性染色体 (XX/XY) 和温度调控, 雌雄个体差异较大, 雌性生长速率较快。温度影响牙鲆幼鱼性腺中 FSH 受体基因 (*fshr*) 的表达量, 而似乎不影响 LH 受体基因的表达<sup>[13]</sup>。FSH 调控 E2 合成的信号通路在牙鲆性别分化过程中也起重要作用<sup>[13]</sup>。Sun 等<sup>[14]</sup>在对斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 的研究中发现 U II 与人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 类似, 能够调控离体的卵巢组织分泌 E2。而牙鲆中 U II 的表达受温度影响<sup>[11]</sup>。这些结果暗示着 FSH 与 CNS 可能存在某种联系。此外, 已有研究表明在大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 和斑马鱼 (*Danio rerio*) 中 *fshr* 不仅只在性腺中表达, 在肾脏中也有表达<sup>[15-16]</sup>。迄今为止, 尚无报道 *fshr* 在 CNS 中是否表达。因此, 本研究探讨 FSH 对牙鲆 dahlgren 细胞放电活动的影响和对 CNS 中 *fshr*、*L-Ca<sup>2+</sup>* 表达量的影响。此外, 还分析在繁殖季节牙鲆脑垂体中促卵泡激素  $\beta$  亚基 (*fsh $\beta$* ) mRNA 或 CNS 中 *fshr* mRNA 与 GSI、*crh*、*UI* 和 *U II* mRNA 相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

电生理实验所用的 36 尾雌性牙鲆 [(600±35) g] 购于上海市江阳水产市场, 于上海海洋大学适应生理实验室暂养。鱼暂养在循环水养殖系统中 2 周以上, 养殖水温 18 °C, 光照 40 lx, 酸碱度 7.8~8.2, 溶解氧 (7.9±0.5) mg/L。利用块状物将鱼击晕, 解剖针破坏鱼大脑使其死亡, 将其尾部切下置于冰上, 解剖得到 1~8 节脊髓并附着尾垂体即为完整的中枢神经。

繁殖季节, 雌性牙鲆中 *fsh $\beta$* 、*fshr*、*crh*、*UI* 和 *U II* 的表达量分析实验在中国水产科学研究院北戴河中心实验站进行, 由该实验站培育的牙鲆用于本实验。实验鱼 (14 尾) 体质量 (1 758±59) g。使用 MS-222 对实验鱼进行麻醉, 采集性腺、脑垂体和 CNS。性腺指数 (GSI, %) = 性腺质量 (GW) / 体质量 (BW) × 100%。脑垂体用于检测 *fsh* 的表达量, 而 CNS 用于检测 *fshr*、*crh*、*UI* 和 *U II* 的表达量。

### 1.2 电生理记录

将 CNS 从脊髓中取出后立即置于电生理平台上, 灌以预冷的任氏液 (NaCl 155 mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 10 mmol/L, KCl 0.5 mmol/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 mmol/L, CaCl<sub>2</sub> 2.12 mmol/L, MgSO<sub>4</sub> 1.0 mmol/L, D-glucose 5.56 mmol/L, 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 10 mmol/L, pH=7.7)。体外电生理记录平台如图 1 所示。玻璃电极 (直径 0.5 mm) 吸附 CNS 的位置位于从后往前数第 3、4 节之间。通过 Neurolog AC NL104 放大器 (Digitimer, 英国) 放大信号 (放大倍数为 1 000 倍); 再通过 AC NL125 滤波器 (仅保留 5 Hz~1.2 kHz 和 50 Hz 陷波滤波器) 筛选电信号; 然后使用 CED micro 1401 数模/模数转换器 (Cambridge Electronic Design, 英国) 将电信号转换成数码信号, 从而被计算机采样软件 Clampex 10.3 识别并记录, 最后使用 CED Spike2 v.5.15 软件将不同细胞放电信号进行分离。CED Spike2 v.5.15 软件能够识别每个细胞不同动作电位的波形并进行分离, 将不同细胞产生的动作电位波形图展示在不同轨迹线上<sup>[17]</sup>。由于在 CNS 中 dahlgren 细胞特有的放电特性 (放电时长 > 2.5 ms, 其他神经元放电小于此时长), 因此可以利用此特性将 dahlgren 细胞甄别出来<sup>[18]</sup>。此外, dahlgren 细胞具有 4

种类型放电模式,即静止型、爆发型、位相型和强直型<sup>[18]</sup>。

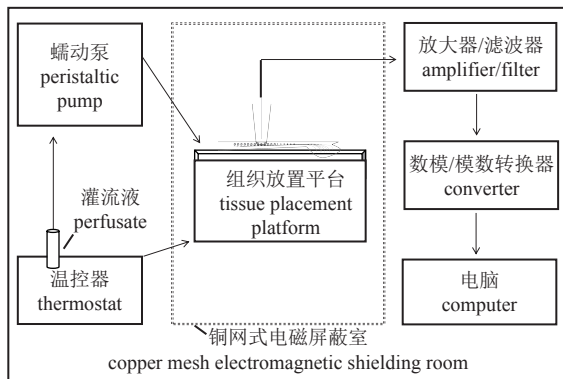


图1 体外电生理记录平台

Fig. 1 Platform for electrophysiology *in vitro*

### 1.3 电生理实验设计

在正式开始实验之前,灌流预冷的任氏液 2 h 使 CNSS 中细胞自发放电稳定。使用任氏液配置促卵泡激素(宁波第二激素厂)溶液(5、10 和 20 IU/mL)灌流 15 min,以灌流 FSH 溶液的前 15 min 作为对照。

在抑制剂实验中,同样以灌流 FSH 溶液(10 IU/mL)的前 15 min 作为对照组,接着灌流 15 min FSH 溶液(10 IU/mL)和促卵泡激素受体结合抑制剂 FRBI-8(南京肽业生物科技有限公司)溶液(40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的混合物,然后单独灌流 FSH 溶液(10 IU/mL) 15 min,最后用任氏液洗脱 15 min。

### 1.4 FSH 对 CNSS 中基因表达量的影响实验设计

为了探究 FSH 对 CNSS 中 *fshr* 和  $L\text{-Ca}^{2+}$  表达的影响,将 CNSS 从脊髓中取出后立即置于电生理平台上,灌以预冷的任氏液 2 h,然后灌流 FSH 溶液(0、5、10 和 20 IU/mL) 30 min 后立即转到液氮中速冻,置于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存,用于后续的研究。

### 1.5 基因相对表达量检测

在 ABI 7500 (Applied Biosystems, 美国)仪器中使用实时荧光定量 PCR 法(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)对脑垂体和 CNSS 中 mRNA 表达水平进行定量分析。用琼脂糖凝胶电泳法和分光光度法检测用 TRIzol 提取的组织总 RNA 的质量。反转录参照 PrimerScript<sup>TM</sup> RT reagent kit with gDNA Eraser (TaKaRa, 日本)试剂说明书。qRT-PCR 反应体系参见 TB Green<sup>®</sup> Premix ExTaq<sup>TM</sup> II (TaKaRa,

<https://www.china-fishery.cn>

日本)试剂说明书。反应参数:  $95^{\circ}\text{C}$  变性 30 s;  $95^{\circ}\text{C}$  5 s;  $60^{\circ}\text{C}$  34 s, 40 个循环;  $95^{\circ}\text{C}$  15 s;  $60^{\circ}\text{C}$  1 min;  $95^{\circ}\text{C}$  15 s; 循环结束后绘制熔解曲线,以检验产物的特异性。参考以往研究,使用  $\beta\text{-actin}$  作为内参基因,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{C}_t}$  法计算基因的相对表达量。 $\beta\text{-actin}$ 、*fsh*、*fshr*、*crh*、*UI* 和 *UII* 的引物由 NCBI 在线 Primer-BLAST 网站设计(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>),并由生物工程(上海)股份有限公司进行合成(表 1)。

表 1 基因表达量分析所用的引物序列

Tab. 1 Primer sequences for each gene used for gene transcription analyses

基因 gene	基因序列号 GenBank accession no.	序列(5'→3') sequence (5'→3')
<i><math>\beta\text{-actin}</math></i>	HQ386788	F: GGAAATCGTGC GTGACATTAAG R: CCTCTGGACAACGGAACCTCT
<i>fsh<math>\beta</math></i>	AB042422	F: ACTGGTCGTATGAGGCGAAGCA R: AAGCGTCCG CAGTCAGTGTTC
<i>fshr</i>	AB303855	F: GGGCGTCTACCTGGCTGTCATA R: CACTGGCGAACACCGTGATGAA
<i>crh</i>	XM_020087578	F: AAAGGAGGTGAAGGAGGA R: AAGAAGGCAACAAGCAGA
<i>UI</i>	XM_020105024	F: GACCTGCTGAGCGACAAC R: TCATCCTCGGCTATCTGG
<i>UII</i>	XM_020089067	F: ATCTGCTGAGATGCCCTATC R: CTGTTGTTCTCCACCGTCTC
<i>L-Ca<sup>2+</sup></i>	XM_020089067	F: GGAACAAC TGCACAACCGC R: CAGCGCACTGGTTAGGGTAA

### 1.6 数据分析

实验数据均由 GraphPad Prism 8.1 软件进行分析。在电生理实验中使用 Wilcoxon 配对检验分析 FSH 对 dahlgren 细胞放电频率的影响。在灌流药物时细胞的放电频率改变  $\geq 30\%$  时,认为该细胞能够显著响应药物而发生电活动变化。分离得到的每个细胞均纳入数据统计。使用 Dunnett 氏多重比较分析 FSH 灌流组与对照组之间基因表达量的差异。使用 Pearson 氏方法进行不同指标间相关性分析,  $P < 0.05$  认为具有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 FSH 对 dahlgren 细胞放电活动的影响

图 2 中,上方是 CNSS 中细胞总体放电轨迹图,下方是根据 dahlgren 细胞电生理特征并通过



Spike2 软件对总体放电轨迹图分析得到 3 个 dahlgren 细胞的 spike 序列图。这 3 个细胞在 FSH 灌流前放电模式均为位相型, 当灌流 10 IU/mL FSH 溶液时细胞放电模式并未改变, 但是放电频率明显增加。

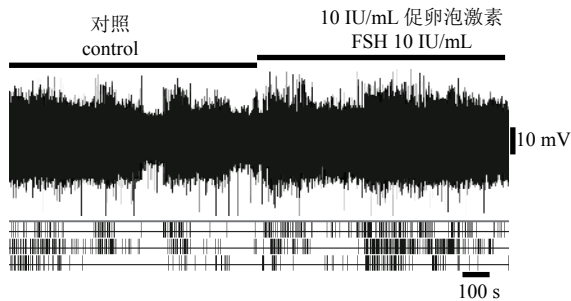


图 2 体外电生理记录 FSH 对 CNSS 中 dahlgren 细胞放电活动的影响

图中最上面一行记录的是总放电活动的变化, 下面每行记录的是由 Spike2 软件分析出来的单个 dahlgren 细胞 spike 序列图; 以灌流 15 min FSH 10 IU/mL 之前的 15 min 作为对照

Fig. 2 Extracellular multiunit recording from dahlgren cells in the CNSS, showing the response to superfusion with FSH

Representative raw traces (top) showing the response to superfusion with FSH (10 IU/mL, 15 min) by extracellular multiunit recordings and using Spike2 separated out individual units (bottom) from the raw trace; discharge activity of dahlgren cell was analyzed in the last 15 min of the control recording time (control), FSH treatment (10 IU/mL, 15 min)

FSH 对 dahlgren 细胞放电活动可能具有一定的浓度依赖性。在 5 IU/mL FSH 灌流期间, 6/14 (14 个细胞来自 4 尾实验鱼) 个细胞放电频率增加。在 10 IU/mL FSH 或 20 IU/mL FSH 灌流期间, 9/13

(13 个细胞来自 4 条鱼) 或 13/14 (14 个细胞来自 4 尾实验鱼) 个细胞放电频率增加。从总的 dahlgren 细胞群放电频率来说, 5 IU/mL FSH 能够轻微促进 dahlgren 细胞的放电频率, 但是无显著差异 ( $P>0.05$ )。而在灌流 10 IU/mL FSH 或 20 IU/mL FSH 溶液时 dahlgren 细胞放电频率显著升高 ( $P<0.05$ ) (图 3)。在总体放电模式方面, 灌流 5 IU/mL FSH 或 10 IU/mL FSH 溶液时细胞放电模式无显著变化 ( $P>0.05$ ) (表 2)。而灌流 20 IU/mL FSH 时, 静止型放电细胞个数减少 (6/14 转变为 0/14), 而爆发型放电细胞个数增多 (1/14 转变为 5/14), 细胞总体放电模式发生显著变化 ( $P<0.05$ ) (表 2)。

为了确定 FSH 是否作用于 FSHR 进而影响 dahlgren 细胞的放电频率, 进行了抑制剂实验。通过 Spike2 软件对总体放电轨迹图分析得到 4 个 dahlgren 细胞。10 IU/mL FSH 能够促进细胞放电频率, 但是在灌流 10 IU/mL FSH 和 40  $\mu$ g/mL FRBI-8 的混合溶液时细胞放电频率并未降低, 然而在随后单独灌流 10 IU/mL FSH 时细胞放电频率降低, 在随后的洗脱阶段细胞放电频率反而增高 (图 4)。在第 1 个 FSH 单独灌流时, 12/17 个细胞放电频率增加; 在 FSH 和 FRBI-8 共同灌流时, 5/17 个细胞放电频率较低; 在第 2 个 FSH 单独灌流时, 10/17 个细胞放电频率降低; 然而, 9/17 个细胞在洗脱期放电频率增加。经分析, 在第 1 个 FSH 单独灌流时细胞的放电频率显著升高 ( $P<0.05$ )。然而, 在随后 FSH 和 FRBI-8 共同灌流时细胞的放电频率无显著变化 ( $P>0.05$ )。此外, 第 2 个 FSH 单独灌流时细胞的放电频率显著低于 FSH

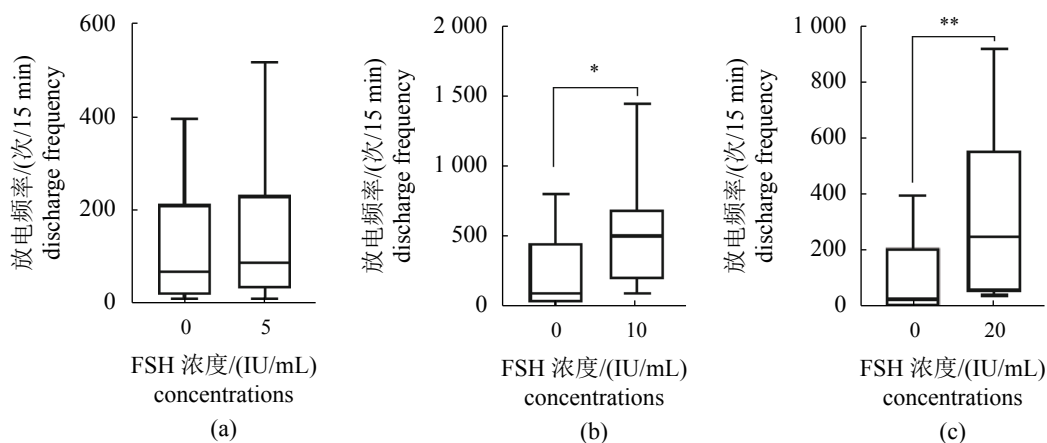


图 3 不同浓度 FSH 对 CNSS 中 dahlgren 细胞放电频率的影响

(a) FSH 5 IU/mL, (b) FSH 10 IU/mL, (c) FSH 20 IU/mL. \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , 下同

Fig. 3 Changes in dahlgren cell discharge frequency in response to FSH

(a) FSH 5 IU/mL, (b) FSH 10 IU/mL, (c) FSH 20 IU/mL. \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , the same below

表 2 FSH 对 dahlgren 细胞放电模式的影响

Tab. 2 Changes in dahlgren cell discharge pattern in response to FSH

模式 pattern	对照 control	5 IU/mL 促卵泡激素 FSH 5 IU/mL	对照 control	10 IU/mL 促卵泡激素 FSH 10 IU/mL	对照 control	20 IU/mL 促卵泡激素 FSH 20 IU/mL
静止型 silent	4	2	2	0	6	0
爆发型 burst	0	1	2	3	1	5
强直型 rigid	0	0	1	2	0	2
位相型 phasic	10	11	8	8	7	7

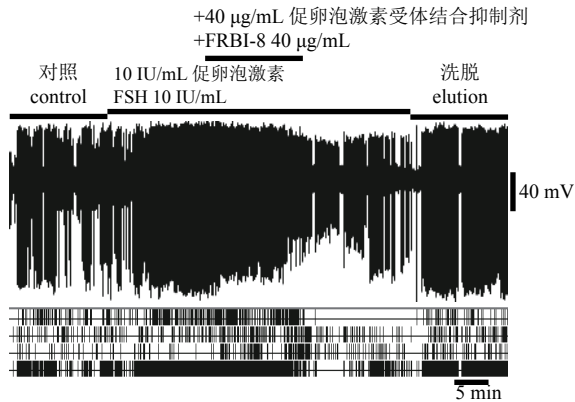


图 4 FRBI-8 对 dahlgren 细胞放电活动的影响

先灌流 FSH(10 IU/mL)15 min, 接着灌流 FSH(10 IU/mL) 和 FSH 受体结合抑制剂 FRBI-8(40 μg/mL) 混合物 15 min, 然后单独灌流 FSH(10 IU/mL)15 min, 随后洗脱 15 min。图中最上面一行记录的是总放电活动的变化, 下面每行记录的是由 Spike2 软件分析出来的单个 dahlgren 细胞 Spike 序列图

Fig. 4 Effect of FRBI-8 in the activity of dahlgren cell

The response of dahlgren cells to superfusion with FSH (10 IU/mL,15 min), then 15 min superfusion with FSH (10 IU/mL) and FSH receptor binding inhibitor FRBI-8 (40 μg/mL), after 15 min superfusion with FSH (10 IU/mL) alone and elution period. Lower traces show activity of individual units separated out from the raw trace by Spike2

和 FRBI-8 共同灌流阶段 ( $P < 0.05$ ), 而在随后的洗脱阶段细胞的放电频率呈现上升趋势 ( $P = 0.06$ ) (图 5)。

### 2.2 FSH 对 CNSS 中 *fshr* 和 $L-Ca^{2+}$ 表达的影响

与对照组相比, FSH 对离体的 CNSS 急性灌流 30 min 后 *fshr* 的表达量无显著差异 (5 IU/mL FSH:  $P > 0.05$ , 10 IU/mL FSH:  $P > 0.05$ , 20 IU/mL FSH:  $P > 0.05$ )。5 IU/mL FSH 和 10 IU/mL FSH 灌流组其  $L-Ca^{2+}$  的表达量与对照组相比无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 但是 20 IU/mL FSH 灌流组其  $L-Ca^{2+}$  的表达量显著上调 ( $P < 0.05$ ) (图 6)。

### 2.3 繁殖季节 *fshβ* 或 *fshr* 与 *crh*、*UI* 和 *UII* 表达量的相关性

对繁殖季节雌性牙鲈 GSI 分别与 *fshβ* 和 *fshr*

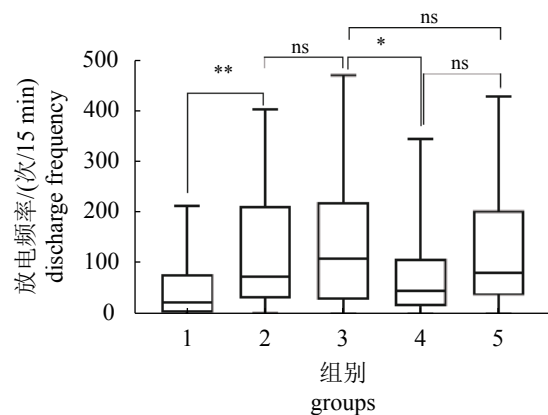


图 5 FRBI-8 对 CNSS 中 dahlgren 细胞放电频率的影响

1. 对照组; 2. FSH (10 IU/mL) 灌流; 3. FSH (10 IU/mL) 和 FRBI-8 (40 μg/mL) 混合物灌流; 4. FSH (10 IU/mL) 灌流; 5. 洗脱阶段。ns. 无统计学意义

Fig. 5 Changes in dahlgren cells discharge frequency in response to FRBI-8

1. control; 2. FSH (10 IU/mL) treatment; 3. FRBI-8 (40 μg/mL) plus FSH (10 IU/mL) treatment; 4. FSH (10 IU/mL) treatment; 5. elution period; ns. not statistically significant

的表达量进行相关性分析, 结果显示, GSI 与 *fshβ* 的表达量呈显著正相关 ( $r = 0.77, P < 0.01$ ), 而与 *fshr* 的表达量无显著相关性 ( $r = -0.24, P > 0.05$ )。对 *fshβ* 与 *fshr* 的表达量进行相关性分析, 结果表明二者无显著相关性 ( $r = 0.04, P > 0.05$ )。对 *fshβ* 分别与 *crh*、*UI* 和 *UII* 的表达量进行相关性分析, 结果表明 *fshβ* 与 *crh* 和 *UI* 的表达量无显著相关性 ( $r = 0.01, P > 0.05$  和  $r = 0.49, P > 0.05$ ), 而与 *UII* 的表达量呈显著正相关 ( $r = 0.56, P < 0.05$ )。对 *fshr* 分别与 *crh*、*UI* 和 *UII* 的表达量进行相关性分析, 结果表明 *fshr* 与 *crh*、*UI* 和 *UII* 的表达量均无显著相关性 ( $r = 0.12, P > 0.05$ ;  $r = 0.06, P > 0.05$  和  $r = 0.09, P > 0.05$ ) (表 3)。

### 3 讨论

本研究主要探讨了 FSH 对大型神经内分泌细

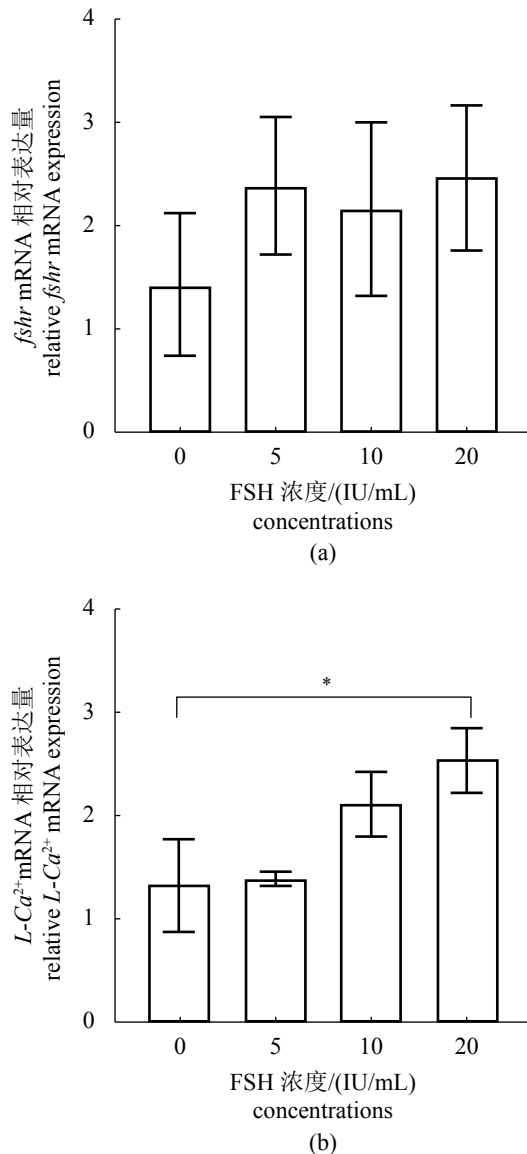


图6 FSH对CNSS中*fshr*和*L-Ca<sup>2+</sup>*表达量的影响

数据以平均值±标准误(mean±SE)表示

Fig. 6 Effects of superfusion with FSH on the relative mRNA expression for *fshr* and *L-Ca<sup>2+</sup>* in CNSS

Data are shown as mean±SE

胞(dahlgren细胞)活动的影响。实验结果表明, FSH调控牙鲆尾部神经内分泌系统的活动。离体电生理实验结果表明, FSH结合FSHR进而提高dahlgren细胞放电频率, 而且可能诱导部分细胞由静止型放电转变成爆发型放电。离体的CNSS暴露于20 IU/mL FSH 30 min后, *L-Ca<sup>2+</sup>*的表达量显著上调。此外, *fsh $\beta$* 的表达量与GSI和U II的表达量显著相关。

神经内分泌细胞的电活动变化常与其分泌神经肽的活动联系在一起。大量研究表明FSH在调

控早期性腺分化与发育中起重要作用, 而关于FSH对细胞电活动的影响研究较少。在对人卵丘细胞(human cumulus oophorus cells)<sup>[19]</sup>、大鼠塞尔托利氏细胞(rat sertoli cells)<sup>[20]</sup>和猪卵巢颗粒细胞(swine granulosa cells)<sup>[21]</sup>的研究中表明, FSH可促进细胞电生理活动。在本实验中发现相似的情况, FSH促进了dahlgren细胞的放电频率。细胞放电频率的增加, 意味着细胞分泌活动的增强<sup>[22-24]</sup>。此外, 神经分泌细胞的肽分泌活动不仅与其放电频率有关, 还与其放电模式有关。高频率的爆发型放电是细胞提高神经肽分泌效率的基础<sup>[24-25]</sup>。在本研究中发现FSH诱导部分细胞由静止型放电转变为爆发型放电。这些结果表明FSH可能促进dahlgren细胞神经肽的分泌活动。

FSH通过与细胞膜上的FSHR结合, 进而引导细胞发生一系列生理活动。FRBI-8是从哺乳动物体内发现的一种8肽化合物, 能够阻断FSH与FSHR结合, 抑制腺苷酸环化酶-蛋白激酶A(cAMP-PKA)或三磷酸肌醇(IP3)信号通路<sup>[26]</sup>。在本实验中发现FRBI-8可以抑制FSH诱导的dahlgren细胞放电频率的增加。可能由于FSH和FRBI-8与FSHR具有较高的亲和力或FSH和FRBI-8结合FSHR诱导下游效应物持续发射信号, 进而导致FRBI-8抑制dahlgren细胞放电现象延迟。此外, 在不同性腺发育状态中, *fshr*表达量的变化的稳定性因物种而异<sup>[15-16, 27-28]</sup>。Andersona等<sup>[29]</sup>在银大麻哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)的研究中发现FSH轻微提高离体的卵母细胞*fshr*的表达量。该结果与本实验结果相似, 离体的CNSS在FSH灌流后*fshr*的表达量无显著变化, 但是平均值较对照组高。这些结果表明, FSH通过FSHR调节dahlgren细胞放电活动。

在哺乳动物中, FSH能够激发细胞外[Ca<sup>2+</sup>]通过L-Ca<sup>2+</sup>涌入细胞内, 进而改变细胞电生理活动<sup>[19-21]</sup>。[Ca<sup>2+</sup>]流入细胞与细胞进行分泌活动和突触活动调节有关。L-Ca<sup>2+</sup>是dahlgren细胞发生爆发型放电, 以此促进神经肽分泌效率的基础<sup>[18, 22, 25]</sup>。以往的研究发现, 在谷氨酸的作用下dahlgren细胞爆发型放电减少, 同时L-Ca<sup>2+</sup>的表达量下调<sup>[30]</sup>。本实验的结果与谷氨酸的作用相反, 在FSH灌流后L-Ca<sup>2+</sup>的表达量显著上调。因此, 这些结果表明L-Ca<sup>2+</sup>可能参与FSH促进dahlgren细胞放电活动。

随着卵巢的发育, 牙鲆脑垂体中FSH和血浆中E2的含量逐渐升高<sup>[31]</sup>。本实验的结果与Kajimura

表3 雌性牙鲆 *fshβ* 或 *fshr* 与 *crh*、*U I* 和 *U II* 表达量的相关性Tab. 3 Correlation analysis between *fshβ* or *fshr* and *crh*, *U I*, *U II* mRNA relative levels of female *P. olivaceus*

相关性分析 correlation analysis		<i>fshβ</i> mRNA 相对表达量 relative <i>fshβ</i> mRNA expression	<i>fshr</i> mRNA 相对表达量 relative <i>fshr</i> mRNA expression
性腺指数/% gonadosomatic index	相关系数 correlation factor	0.77	-0.24
	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	0.001*	0.42
<i>fshr</i> mRNA 相对表达量 relative <i>fshr</i> mRNA expression	相关系数 correlation factor	0.04	
	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	0.89	
<i>crh</i> mRNA 相对表达量 relative <i>crh</i> mRNA expression	相关系数 correlation factor	0.01	0.12
	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	0.97	0.68
<i>U I</i> mRNA 相对表达量 relative <i>U I</i> mRNA expression	相关系数 correlation factor	0.49	0.06
	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	0.07	0.85
<i>U II</i> mRNA 相对表达量 relative <i>U II</i> mRNA expression	相关系数 correlation factor	0.56	0.09
	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	0.04*	0.76

注：脑垂体中检测 *fshβ* 的表达量，CNSS 中检测 *fshr*、*crh*、*U I* 和 *U II* 的表达量；\*， $P < 0.05$

Notes: *fshβ* mRNA relative levels in the pituitary and *fshr* mRNA, *crh* mRNA, *U I* mRNA, and *U II* mRNA in the caudal neurosecretory system (CNSS); \*， $P < 0.05$

等<sup>[32]</sup>的研究结果一致，牙鲆脑垂体中 *fshβ* 的表达量与 GSI 呈显著正相关。这些结果暗示着脑垂体中 *fshβ* 的表达量在一定程度上能够反映血浆中 FSH 的含量。已有研究表明在大西洋鳕 (*Gadus morhua*)<sup>[27]</sup> 和斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)<sup>[28]</sup> 体内随着性腺的发育，卵巢中 *fshr* 的表达量保持相对稳定的状态。该结果与本实验结果相似，CNSS 中 *fshr* 的表达量与 *fshβ* 的表达量和 GSI 均无显著相关性。此外，*fshβ* 与 *crh* 和 *U I* 的表达量均无显著相关性，但是与 *U II* 的转录水平呈显著正相关。Lu 等<sup>[8]</sup> 的研究表明，血浆中 *U II* 和  $[Ca^{2+}]$  的含量与 CNSS 中 *L-Ca^{2+}* 的表达量均与 GSI 呈现平行的动态变化。此外，能被 *U II* 所标记的 T2 型 dahlgren 细胞通常表现为静止型放电<sup>[22]</sup>。在本实验中发现 FSH 可以诱导部分细胞由静止型放电转向爆发型放电。这些结果进一步表明了 FSH 可能调控 CNSS 中 *U II* 的合成和分泌。

牙鲆的性别主要由温度和 FSH 信号通路决定。高温显著抑制了牙鲆性腺中 *fshr* 的表达<sup>[13]</sup>。FSH 可以缓解高温对银大麻哈鱼性腺中 *fshr* 表达的抑制作用<sup>[29]</sup>。此外，温度能够影响牙鲆 dahlgren 细胞的活动<sup>[12]</sup>。处于高温环境中的牙鲆血浆中 *U II* 的含量、CNSS 中 *U II* 的表达量以及 *U II* 标记的

dahlgren 细胞数量均低于处于低温环境中的个体<sup>[11]</sup>。而 *U II* 与 hCG 相似，能够促进斜带石斑鱼卵巢 E2 的分泌<sup>[14]</sup>。上述结果表明 FSH 可能调控 *U II* 进一步调节性腺分化，但还需进一步探讨。

综上所述，本实验结果表明，FSH 可能通过促进 *L-Ca^{2+}* 的表达，进而促进放电频率和诱导细胞由静止型放电转向爆发型放电。此外，*U II* 与 FSH 在生理功能上的紧密联系表明 *U II* 可能在鱼类性腺分化和发育过程中发挥重要作用。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] Levavi-Sivan B, Bogerd J, Mañanós E L, et al. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(3): 412-437.
- [2] Mylonas C C, Fostier A, Zanuy S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(3): 516-534.
- [3] Schreck C B. Stress and fish reproduction: the roles of allostasis and hormesis[J]. *General and Comparative*



- Endocrinology*, 2010, 165(3): 549-556.
- [4] 吕为群, 桂建芳. 鱼类应激应对策略及其在抗逆育种中的应用[J]. 水产学报, 2020, 44(3): 505-513.  
Lü W Q, Gui J F. Stress coping strategy and its application in stress resistance breeding in fish[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(3): 505-513 (in Chinese).
- [5] 吕为群, 程若冰, 兰兆辉. 电生理技术在鱼类尾部神经内分泌系统研究中的应用[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(4): 780-785.  
Lü W Q, Cheng R B, Lan Z H. The application of electrophysiological techniques in the study on the fish caudal neurosecretory system[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(4): 780-785 (in Chinese).
- [6] McCrohan C R, Lu W Q, Brierley M J, *et al.* Fish caudal neurosecretory system: a model for the study of neuroendocrine secretion[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2007, 153(1-3): 243-250.
- [7] Chen H, Mu R. Seasonal morphological and biochemical changes of Dahlgren cells implies a potential role of the caudal neurosecretory system (CNSS) in the reproduction cycle of teleostean fish[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2008, 34(1): 37-42.
- [8] Lu W Q, Worthington J, Riccardi D, *et al.* Seasonal changes in peptide, receptor and ion channel mRNA expression in the caudal neurosecretory system of the European flounder (*Platichthys flesus*)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2007, 153(1-3): 262-272.
- [9] 徐根兴, 朱洪文. 团头鲂尾部神经分泌系统的超微结构及其在人工催产过程中的变化[J]. 水产学报, 1986, 10(2): 205-211.  
Xu G X, Zhu H W. The ultrastructural changes of the caudal neurosecretory system of *Megalobrama amblycephala* during the artificially induced spawning[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1986, 10(2): 205-211 (in Chinese).
- [10] Marley R, Lu W Q, Balment R J, *et al.* Cortisol and prolactin modulation of caudal neurosecretory system activity in the euryhaline flounder *Platichthys flesus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2008, 151(1): 71-77.
- [11] Yuan M Z, Li X X, Long T Y, *et al.* Dynamic responses of the caudal neurosecretory system (CNSS) under thermal stress in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Frontiers in Physiology*, 2020, 10: 1560.
- [12] Yuan M Z, Li X X, Lu W Q. The caudal neurosecretory system: a novel thermosensitive tissue and its signal pathway in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Journal of Neuroendocrinology*, 2020, 32(6): e12876.
- [13] Yamaguchi T, Yamaguchi S, Hirai T, *et al.* Follicle-stimulating hormone signaling and Foxl2 are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 359(4): 935-940.
- [14] Sun C Y, Duan D, Li B, *et al.* UH and UT in grouper: Cloning and effects on the transcription of hormones related to growth control[J]. *Journal of Endocrinology*, 2013, 220(1): 35-48.
- [15] Jia Y D, Sun A, Meng Z, *et al.* Molecular characterization and quantification of the follicle-stimulating hormone receptor in turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2016, 42(1): 179-191.
- [16] Kwok H F, So W K, Wang Y J, *et al.* Zebrafish gonadotropins and their receptors: I. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors-evidence for their distinct functions in follicle development[J]. *Biology of Reproduction*, 2005, 72(6): 1370-1381.
- [17] Lan Z H, Zhang W, Xu J L, *et al.* Modulatory effect of dopamine receptor 5 on the neurosecretory Dahlgren cells of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2018, 266: 67-77.
- [18] Brierley M J, Ashworth A J, Craven T P, *et al.* Electrical activity of caudal neurosecretory neurons in seawater-and freshwater-adapted flounder: responses to cholinergic agonists[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2003, 206(Pt 22): 4011-4020.
- [19] Ayres L S, Bos-Mikich A, Frantz N, *et al.* Electrophysiological responses to different follicle-stimulating hormone isoforms on human cumulus oophorus cells: preliminary results[J]. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia*, 2018, 40(12): 763-770.
- [20] Jacobus A P, Loss E S, Wassermann G F. Pertussis toxin nullifies the depolarization of the membrane potential and the stimulation of the rapid phase of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  entry through L-type calcium channels that are produced by



- follicle stimulating hormone in 10- to 12-day-old rat sertoli cells[J]. *Frontiers in Physiology*, 2010, 1: 138.
- [21] Flores J A, Veldhuis J D, Leong D A. Follicle-stimulating hormone evokes an increase in intracellular free calcium ion concentrations in single ovarian (granulosa) cells[J]. *Endocrinology*, 1990, 127(6): 3172-3179.
- [22] Brierley M J, Ashworth A J, Banks J R, *et al.* Bursting properties of caudal neurosecretory cells in the flounder *Platichthys flesus*, *in vitro*[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2001, 204(Pt 15): 2733-2739.
- [23] Hasebe M, Oka Y. High-frequency firing activity of GnRH1 neurons in female medaka induces the release of GnRH1 peptide from their nerve terminals in the pituitary[J]. *Endocrinology*, 2017, 158(8): 2603-2617.
- [24] Cazalis M, Dayanithi G, Nordmann J J. The role of patterned burst and interburst interval on the excitation-coupling mechanism in the isolated rat neural lobe[J]. *Journal of Physiology*, 1985, 369: 45-60.
- [25] Brierley M J, Bauer C S, Lu W, *et al.* Voltage- and Ca<sup>2+</sup>-dependent burst generation in neuroendocrine Dahlgren cells in the teleost *Platichthys flesus*[J]. *Journal of Neuroendocrinology*, 2004, 16(10): 832-841.
- [26] Gong Z D, Liang H Q, Deng Y Y, *et al.* FSH receptor binding inhibitor influences estrogen production, receptor expression and signal pathway during *in vitro* maturation of sheep COCs[J]. *Theriogenology*, 2017, 101: 144-150.
- [27] Mittelholzer C, Andersson E, Taranger G L, *et al.* Molecular characterization and quantification of the gonadotropin receptors FSH-R and LH-R from Atlantic cod (*Gadus morhua*)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 160(1): 47-58.
- [28] Kumar R S, Ijiri S, Trant J M. Molecular biology of the channel catfish gonadotropin receptors: 2. Complementary DNA cloning, functional expression, and seasonal gene expression of the follicle-stimulating hormone receptor[J]. *Biology of Reproduction*, 2001, 65(3): 710-717.
- [29] Anderson K, Luckenbach J A, Yamamoto Y, *et al.* Impacts of Fsh, Igf1, and high temperature on the expression of genes involved in steroidogenesis, cell communication, and apoptosis in isolated coho salmon previtellogenic ovarian follicles[J]. *Aquaculture*, 2019, 506: 60-69.
- [30] Lan Z H, Xu J L, Wang Y J, *et al.* Modulatory effect of glutamate GluR2 receptor on the caudal neurosecretory Dahlgren cells of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2018, 261: 9-22.
- [31] Pham K X, Amano M, Kurita Y, *et al.* Changes in the immunostaining intensities of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during ovarian maturation in the female Japanese flounder[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2008, 34(4): 357-365.
- [32] Kajimura S, Yoshiura Y, Suzuki M, *et al.* cDNA cloning of two gonadotropin  $\beta$  subunits (GTH-I $\beta$  and-II $\beta$ ) and their expression profiles during gametogenesis in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2001, 122(2): 117-129.

## Follicle-stimulating hormone modulation of caudal neurosecretory system activity in the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

JIANG Pengxin<sup>1,2</sup>, PAN Xinbei<sup>1,2</sup>, LÜ Weiqun<sup>1,2,3\*</sup>

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education,  
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education,  
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. International Research Center for Marine Biosciences at Shanghai Ocean University,  
Ministry of Science and Technology, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** The olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) occupies an important position in the mariculture. It has proved as an useful model for study of caudal neurosecretory system (CNSS). The CNSS is a unique neurosecretory structure of fish that may be involved in thermoregulation and reproduction. Previous studies suggest that follicle-stimulating hormone (FSH) signaling is involved in the temperature-dependent sex determination and reproduction in olive flounder. However, a direct effect of FSH on Dahlgren cells remains underexplored. Here, we examined the electrophysiological response of Dahlgren cell population of the CNSS to FSH and the transcription of related key genes of CNSS. In addition, the gonadosomatic index (GSI, %), the expression level of *fshβ* in pituitary, and FSH receptor gene (*fshr*), corticotropin-releasing hormone gene (*crh*), urotensin I gene (*U I*) and urotensin II gene (*U II*) in CNSS during the breeding season were also analyzed. We found that FSH increased overall discharge frequency and may have changed the discharge pattern from silent to burst discharge in a subpopulation of Dahlgren cells. The effect of FSH on Dahlgren cells discharge activity was blocked by the FSH-receptor binding inhibitor (FRBI-8). The mRNA levels of *fshr* did not differ between FSH treatment and control group. While treatment with FSH stimulated the expression of L-type voltage-dependent calcium channel (*L-Ca<sup>2+</sup>*). In addition, a positive correlation was observed between the *fshβ* mRNA levels and GSI or *U II* mRNA levels during the breeding season. These findings proved for the first time that FSH could act as a modulator within the CNSS and enhanced our understanding of the physiological role of the CNSS in reproduction and seasonal adaptation.

**Key words:** *Paralichthys olivaceus*; caudal neurosecretory system; neuromodulation; follicle-stimulating hormone (FSH); urotensin II

**Corresponding author:** LÜ Weiqun. E-mail: wqlv@shou.edu.cn

**Funding project:** National Natural Science Foundation of China (31572599, 41376134)