

文昌鱼

生殖神经内分泌 生理学论文集

方永强 著



海洋出版社

文昌鱼生殖神经内分泌生理学 论 文 集

方永强 著

海洋出版社

1999年·北京

图书在版编目(CIP)数据

文昌鱼生殖神经内分泌生理学论文集/方永强著. - 北京: 海洋出版社, 1999.6
ISBN 7-5027-4256-5

I. 文… II. 方… III. ① 文昌鱼科-生殖生理学-文集 ② 文昌鱼科-神经生理学-文集 ③ 文昌鱼科-内分泌学-文集 IV. Q959.287.05-53

中国版本图书馆 CIP 数据核字(1999)第 13474 号

责任编辑: 宋 敏
责任印制: 严国晋

海洋出版社 出版发行

(100081 北京市海淀区大慧寺路 8 号)

北京海洋印刷厂印刷 新华书店发行所经销

1999 年 6 月第 1 版 1999 年 6 月北京第 1 次印刷

开本: 787×1092 1/16 印张: 23.5

字数: 700 千字 印数: 1~300 册

定价: 40.00 元

海洋版图书印、装错误可随时退换

序

文昌鱼[*Branchiostoma belcheri* (Gray)]是脊椎动物头索类生活的现存种类,具有原始的脊索动物基本构造特征,是介于无脊椎动物进化到脊椎动物的过渡类型,因而被认为是脊椎动物的祖先。正如达尔文所指出:文昌鱼的发现使人们看到了5亿年前脊椎动物始祖的模样。因此,系统深入地研究文昌鱼对于了解动物界系统进化的进程和规律,具有重大的理论意义。

对文昌鱼生殖神经内分泌调控系统的研究是文昌鱼研究的一个十分重要的方面。自19世纪末文昌鱼哈氏窝(Hatschek's pit)发现以来,国内外许多学者对它的结构和功能进行研究,并用比较内分泌学的观点探讨文昌鱼在脊椎动物生殖内分泌调控系统(脑—脑垂体—性腺轴)的进化发展过程中的位置。我国以方永强教授为学术带头人的课题组在这一研究领域进行了长期而深入的研究,在文昌鱼哈氏窝的内分泌功能、文昌鱼生殖激素,神经递质和神经肽的定位与性腺发育和生殖活动的关系,文昌鱼生殖周期和生殖细胞及其发育的生态条件,外源性激素在文昌鱼性腺发育成熟和产卵中的作用等方面取得了突破性进展,证明了文昌鱼不仅已经形成原始的生殖内分泌调控轴,即:脑泡神经组织—哈氏窝—性腺轴,可以和脊椎动物的脑—脑垂体—性腺轴相比拟;而且,整个调控系统的作用机理也和脊椎动物相似,即:感受器把外界环境因子的信号通过神经传入到脑泡,产生神经递质或神经肽,输送到哈氏窝,刺激哈氏窝释放促性腺激素物质,作用于性腺产生性类固醇激素,进而促进生殖细胞发育成熟并诱导排精和排卵。这些开创性研究成果在学术上居国际领先地位。

《文昌鱼生殖神经内分泌生理学论文集》选编了方永强教授及其课题组已发表的45篇论文。该论文集的特点是内容丰富、新颖,论证详实,系统性强。该论文集的出版,对于进一步深入研究各种神经内分泌因子调节文昌鱼生殖活动的作用机理,文昌鱼促性腺激素释放激素和促性腺激素的生理学、生物化学和分子生物学,以及人工调控和诱导文昌鱼生殖活动等都具有很重要的参考价值和指导意义。同时,对充实和发展比较生理学和比较内分泌学以及生殖内分泌的进化提供了新的线索和证据,并在这些学科领域培养青年学者和开展国际交流,亦将起积极的作用。

中国工程院院士 林浩熊

1998年3月10日

前言

1774年 Pallas 从他的朋友那里得到一尾采自 Carnwall 沿海的文昌鱼,使其成为第一个鉴定者。他定为 *Limax lanceolatus*, 当时误认为是一种软体动物,这就是世界上首次发现的文昌鱼(*Amphioxus*, *Lancelet*, *Branchiostoma*), 至今已有两百多年。现已查明文昌鱼广泛分布在热带和温带海域,成体特征是栖息在含沙和沙壳混合的底质中。幼体可能为一种浮游生物,生活在近岸和远洋环境中。据有关资料,全世界有报道产文昌鱼的国家是英国、法国、德国、俄罗斯、意大利、美国、以色列、墨西哥、日本、新西兰、澳大利亚、新加坡、印度和中国,分布在大西洋、太平洋和印度洋。我国文昌鱼资源分布在厦门、青岛等地,从资源的数量来看,我国占首位。在 50 年代,福建省厦门市刘五店文昌鱼资源最为丰富,形成文昌鱼渔场。据报道现有文昌鱼有 50 种,根据调查证实,人们公认的只有 29 种。根据文昌鱼对称的差别(meristic variation),将其区分为两大类, *Branchiostoma* 和 *Epigonichthys*, 它们各自的特征是,前者身体两侧有性腺,这就是人们所说的文昌鱼,后者则只在身体右侧有性腺,与张玺教授报道文昌鱼科另一属称为偏文昌鱼属(Genre *Asymmetron* Andrews),短刀偏文昌鱼(*Asymmetron cultellum*)颇为类似。

众所周知,文昌鱼是介于无脊椎动物进化到脊椎动物的过渡类型,在生物进化方面有很高的研究价值,它可作为脊椎动物起源的钥匙。根据 1774~1996 年最新统计,正式发表的文昌鱼论文约有 1 368 篇;在不同研究学科领域的分布是,文昌鱼分类、生态分布占 413 篇;胚胎发育和发育的基因调控占 139 篇;普通生理学、解剖学、酶学和组织化学占 160 篇;生殖神经内分泌和神经系统,脊神经支配各占 101 篇;从不同研究领域论述文昌鱼在进化中的作用占 101 篇;肌肉系统结构功能,肌节占 60 篇;消化系统,摄食机制,纤毛运动占 72 篇;血液循环、呼吸和排泄器官占 47 篇;皮肤感受器结构与功能占 23 篇;内柱结构与功能占 35 篇;脊索结构与功能占 43 篇;染色体 11 篇和其他方面占 62 篇。这里值得说明的是,上述统计论文数量与 Gans 统计文昌鱼文献资料 2 700 篇,相差一半,其原因是 Gans 的资料中有一些要打问号的,或文章题目与文昌鱼内容相关较少,没有统计在内。但我们认为上述 1 368 篇论文基本上可以反映两百年来文昌鱼研究的现状。另一方面,这里必须指出的是,1923 年在厦门大学担任动物学教授美国人 S.F. Light 在美国科学发表了题为“在厦门大学附近文昌鱼渔业”一文以来,我国厦门文昌鱼资源引起国内外生物学界的关注。在 30 年代,我国学者金德祥教授的文昌鱼研究论文在《菲律宾科学杂志》上发表,在此时期,厦大学生物系主任陈子英教授,在 1936 年发表了题为“福建南部的厦门文昌鱼的历史”,同年张玺、顾光中发表了“厦门文昌鱼的分类位置”,卢嘉锡完成了“厦门文昌鱼的化学分析”等。50~60 年代,我国文昌鱼研究进入发展昌盛时期,我国实验胚胎学奠基人之一童第周教授及他的夫人叶毓芬教授和他的学生吴尚勤教授在文昌鱼实验胚胎学方面作出了突出的贡献。近 20 年来,国内一些研究所和高等院校对文昌鱼生态环境、资源分布,文昌鱼碱性磷酸酶纯化测定,卵内原肌凝蛋白,副肌球蛋白的分离纯化以及陈大元教授在文昌鱼受精机理等方面也取得了重要的成果。与此同时,从 80 年代至今,我国两个实验室,中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室和国家海洋局

第三海洋研究所生殖内分泌生理学实验室在文昌鱼生殖神经内分泌调控研究方面取得了突破性进展。上面所统计的 101 篇生殖神经内分泌的文献中,我国学者就有 56 篇,占一半以上。国内外著名的比较内分泌学家,张致一教授及其同事在文昌鱼生殖内分泌调控方面首先发现了文昌鱼哈氏窝存在 LH 免疫阳性细胞,性腺中存在性类固醇激素,从而提出了文昌鱼具有生殖激素调控系统的假说。这本论文集就是反映我所从 1981 年开始以及后来与中国科学院动物研究所张崇理教授,山东大学王龙教授,第四军医大学黄威权教授以及开展国际合作研究,通过一系列生理、生化、分子生物学和形态学研究,在文昌鱼生殖神经内分泌生理学领域取得了重大成果,确凿证实了文昌鱼像脊椎动物一样,具有原始的生殖内分泌调控系统。该成果于 1994 年 11 月邀请同行专家组成鉴定委员会,全体专家进行了认真的评审,一致认为该成果在学术上达到国际领先水平。1995 年获得国家海洋局科技进步一等奖,同年获国家自然科学基金三等奖。现在该成果已汇集成册。特请我的同行,中国工程院院士,中国比较内分泌学会理事长,中山大学林浩然教授为本集撰写“序”。在我们研究文昌鱼过程中得到了许多同仁的帮助和支持,现在藉此机会向他们表示深切感谢。这里特别要指出,我国著名的细胞生物学家汪德耀教授,是他在 1980 年倡导和支持我们的研究,在此更要予以深深的谢意。文中不当之处,敬请同仁批评指正。

方永强

1998 年 5 月 20 日

目 次

文昌鱼在生殖内分泌进化中的地位	(1)
New Demonstrations on a Regulatory System of Reproductive Hormone in Amphioxus [<i>Branchiostoma Belcheri</i> (Gray)]	(23)
文昌鱼促黄体素释放素(LH-RH)的周年变化及其与性腺发育的相互关系	(24)
文昌鱼生殖内分泌生理学研究进展	(39)
文昌鱼哈氏窝结构功能的神经内分泌调节研究进展	(44)
心兴奋肽在文昌鱼神经系统中的分布:免疫组织化学的研究	(50)
生长抑素在文昌鱼体内的分布——免疫组织化学的研究	(55)
血管活性肠肽(VIP)在文昌鱼体内免疫组织化学定位的研究	(62)
文昌鱼体内 5-羟色胺免疫组织化学定位的研究	(67)
钙调素在文昌鱼神经系统中的分布	(74)
文昌鱼轮器哈氏窝匀浆对幼体蟾蜍睾丸发育的初步探讨	(77)
文昌鱼哈氏窝匀浆使蟾蜍足细胞释精的超微结构研究	(80)
文昌鱼哈氏窝上皮细胞超微结构的研究	(84)
文昌鱼 LH-RH 的初步分离及其生物活性的测定	(96)
A Lectin Histochemical Study on Carbohydrate Moieties of the Gonadotropin-like Substance in the Epithelial Cells of Hatschek's Pit of <i>Branchiostoma belcheri</i>	(99)
鱼类促性腺激素在文昌鱼哈氏窝免疫细胞化学定位	(106)
GnRH 在文昌鱼脑和哈氏窝的分布	(114)
GnRH 受体在文昌鱼神经系统、哈氏窝和性腺的免疫组织化学定位	(122)
促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)和 GnRHmRNA 在文昌鱼性腺中的定位及其表达	(133)
促黄体素(LH)和人绒毛膜促性腺激素(hCG)在原索动物神经系统、哈氏窝和性腺 中的分布	(139)
厦门文昌鱼卵子发生过程	(146)
厦门文昌鱼卵子发生的超微结构研究	(152)
The Reproductive Organs of <i>Branchiostoma</i>	(170)
A Histochemical Study of the Distribution of Lectin Binding Sites in the Developing Oocytes of the Lancelet <i>Branchiostoma belcheri</i>	(198)
文昌鱼卵巢中滤泡细胞超微结构及功能的研究	(210)
文昌鱼卵子发生中成熟分裂时卵母细胞的超微结构研究	(230)
文昌鱼卵巢的神经支配:超微结构和免疫组织化学研究	(238)
文昌鱼卵母细胞发育成熟过程中高尔基复合体数量的变化	(247)
不同海水盐度和 pH 对文昌鱼精子寿命的影响	(250)
厦门文昌鱼性腺发育的周年变化	(255)

文昌鱼类固醇激素水平与性腺发育相关性的研究·····	(267)
厦门文昌鱼雌雄同体的观察·····	(278)
文昌鱼的精子发生及释精过程·····	(280)
Ultrastructural Study of the Sertoli Cell of the Testis of the Amphioxus [<i>Branchiostoma belcheri</i> (Gray)] ·····	(285)
文昌鱼 Sertoli 细胞超微结构的进一步研究 ·····	(286)
光照周期对文昌鱼生殖细胞发生和性腺生长的影响·····	(292)
光照周期对文昌鱼性腺成熟和产卵的影响·····	(294)
不同水温对文昌鱼性腺发育的影响·····	(299)
文昌鱼卵母细胞发育成熟激素调控的研究·····	(306)
GnRH-A 激发文昌鱼性腺发育的初步研究·····	(321)
丘脑下部促黄体素释放激素类似物(LHRH-A)对文昌鱼精子发生的影响:组织学及其超微结构的研究·····	(332)
促性腺激素释放激素类似物诱导文昌鱼产卵的初步研究·····	(339)
哺乳动物促性腺激素对文昌鱼卵母细胞成熟的影响·····	(342)
促性腺激素释放激素类似物(GnRH-A)对文昌鱼卵细胞成熟及产卵的诱发 ·····	(347)
17 α -甲基睾酮对文昌鱼精子发生的影响 ·····	(351)
钙调素在文昌鱼性腺和表皮分布的研究·····	(356)
文昌鱼生态习性及其资源的保护·····	(360)

CONTENTS

Position in the Evolution of Reproductive Endocrine of Amphioxus, <i>Branchiostoma belcheri</i>	(1)
New Demonstrations on a Regulatory System of Reproductive Hormone in Amphioxus [<i>Branchiostoma belcheri</i> (Gray)]	(23)
Correlation of Annual Change of Luteinizing Hormone-releasing Hormone (LH-RH) with Gonadal Development in Amphioxus	(24)
Progress of the Studies on Reproductive Endocrine Physiology of Amphioxus	(39)
Advance on the Neuroendocrine Regulation of the Structure and Function of Hatschek's Pit in Lancelet	(44)
Distribution of FMRFamide in Nervous System of Amphioxus: A Study of the Immunohistochemistry	(50)
Distribution of Somatostatin in Amphioxus—A Study of Immunohistochemistry	(55)
Immunohistochemical Localization of Vasoactive Intestinal Polypeptide in Amphioxus	(62)
Immunohistochemical Localization of 5-HT in Amphioxus	(67)
Distribution of Calmodulin in the Nervous System of Amphioxus	(74)
The Preliminary Study of Homogenate of the Wheel Organ and Hatschek's Pit of Amphioxus on Testicular Development in Young Toad (<i>Bufo Melanostictus</i>)	(77)
Ultrastructural Study of Sertoli Cell of Toad during Induced Spermiation by Injection of Homogenate of Hatschek's Pit of Amphioxus	(80)
Ultrastructural Study of the Hatschek's Pit Epithelial Cells of Amphioxus	(84)
Preliminary Isolation and Determination of LH-RH and Its Biological Activity in Amphioxus	(96)
A Lectin Histochemical Study on Carbohydrate Moieties of the Gonadotropin-like Substance in the Epithelial Cells of Hatschek's Pit of <i>Branchiostoma belcheri</i>	(99)
Immunocytochemical Localization of Fish Gonadotropin (GTH) in the Brain Vesicle and Hatschek's Pit of Amphioxus	(106)
Distribution of Gonadotropin-releasing Hormone in the Brain and Hatschek's Pit of Amphioxus	(114)
Immunohistochemical Localization of Gonadotropin-releasing Hormone Receptors (GnRHR) in the Nervous System, Hatschek's Pit and Gonads of Amphioxus, <i>Branchiostoma belcheri</i>	(122)
Localization and Expression of GnRH (Gonadotropin-releasing Hormone) and GnRHmRNA in the Gonad of Amphioxus <i>Branchiostoma belcheri</i>	(133)
Distribution of Luteinizing Hormone (LH) and Human Chorionic Gonadotropin (hCG) in the Nervous System, Hatschek's Pit and Gonads of Protochordata	(139)
Process of Oogenesis in Amphioxus	(146)

Ultrastructural Study of Oogenesis in Xiamen Amphioxus	(152)
The Reproductive Organs of <i>Branchiostoma</i>	(170)
A Histochemical Study of the Distribution of Lectin Binding Sites in the Developing Oocytes of the Lancelet <i>Branchiostoma belcheri</i>	(198)
Ultrastructure and Function of Follicle Cell in the Ovary of <i>Branchiostoma belcheri</i>	(210)
Ultrastructural Study of Oocyte during Meiotic Stages of Lancelet Oogenesis	(230)
Innervation of the Ovary in Amphioxus: Ultrastructural and Immunohistochemical Study	(238)
The Change of Golgi Complex in Number in Development and Maturity Processes of Amphioxus	(247)
Effects of Different Seawater Salinity and pH on Sperm Lifespan of Lancelet	(250)
Annual Change of the Gonadal Development of the Amphioxus in Xiamen	(255)
Study on Correlation of Sex Steroid Hormone Level with Gonadal Development in Amphioxus	(267)
Hermaphroditical Observation of Amphioxus	(278)
Process of Spermatogenesis and Spermiation in Amphioxus	(280)
Ultrastructural Study of the Sertoli Cell of the Testis of Amphioxus	(285)
Further Study of the Ultrastructure of the Sertoli Cell of the Testis of Amphioxus	(286)
The Effects of Photoperiod on the Gametogenesis and Gonadal Growth of the Amphioxus	(292)
Effects of Photoperiod on the Gonadal Maturation and Spawning of the Amphioxus	(294)
Effects of Different Temperatures on Gonadal Development in Lancelet, <i>Branchiostoma belcheri</i>	(299)
Hormonal Regulation of Oocyte Development and Maturation of Amphioxus	(306)
Preliminary Study of Gonadotropin-releasing Analogue (GnRH-A) Initiated Gonadal Development of Amphioxus	(321)
The Effects of the Hypothalamic Luteinizing Hormone-releasing Hormone Analogus (LRH-A) on the Spermatogenesis of Amphioxus: A Study of Histology and Ultrastructure	(332)
Study of Gonadotropin Releasing Hormone Analogue Induced Spawning of Amphioxus	(339)
Effects of Mammalian Gonadotropin on Oocyte Maturation of Amphioxus	(342)
Gonadotropic Releasing-hormone Analogus Induced Oocyte Maturation and Spawning in Amphioxus [<i>Branchiostoma belcheri</i> (Gray)]	(347)
Effects of 17 α -methyltestosterone on Spermatogenesis of Amphioxus	(351)
Immunohistochemical Localization of Calmodulin in Amphioxus	(356)
Ecological Habits and Resources Conservation of Amphioxus	(360)

文昌鱼在生殖内分泌进化中的地位

摘 要 评述了近 10 多年来国内外学者先后发现文昌鱼哈氏窝能够合成脊椎动物促性腺激素样物质,体内存在促性腺激素释放素与性腺发育周期呈现正的相关性,以及性腺中存在着性类固醇激素。外源性激素可促进文昌鱼性腺发育成熟及其生殖活动,提示文昌鱼的生殖活动像脊椎动物一样,受生殖激素的调控。这就表明文昌鱼存在着原始的生殖内分泌调控轴,脑泡-哈氏窝-性腺轴,可与脊椎动物的生殖内分泌调控轴相比拟。这为确定文昌鱼在生殖内分泌进化中的地位提供了新的线索。

关键词 文昌鱼,哈氏窝,生殖内分泌,进化,促性腺激素释放素,促性腺激素,性类固醇激素

自从 Pallas(1774)^[1]记述文昌鱼(当时误认为软体动物)至今已有 200 余年。各国学者共发表了 2 700 余篇学术论文^[2],其中我国学者占 100 余篇。这些论文包括文昌鱼生态学和生理学的方方面面,如文昌鱼种类特征及其在各大海域生态分布、栖息环境和食性,解剖学和组织学、胚胎发育、生殖内分泌和生物化学以及近年正在开展的分子生物学等。这些不同学科领域却都围绕一个中心,证明文昌鱼是脊椎动物的祖先,正如达尔文所说“是指示脊椎动物起源的钥匙。”因此文昌鱼研究在理论和学术上有重大的价值。

比较内分泌生理学研究业已证实,生殖内分泌调控系统已在脊椎动物主要纲目不同程度地建立起来了,这个系统包括下丘脑-脑垂体和性腺(卵巢和精巢),称为生殖内分泌调控轴,并分泌相应的生殖激素,如多肽释放激素、糖蛋白质促性腺激素、性腺类固醇激素和前列腺素等。然而,长期以来关于头索类文昌鱼生殖内分泌的状况,几乎是一无所知。只是近十多年来,国内外学者对文昌鱼哈氏窝,中枢神经系统和性腺结构与功能进行了卓有成效的研究,取得了突破性进展,确凿地证明了文昌鱼存在着原始的生殖内分泌调控轴,为脊椎动物的起源和在生殖内分泌的进化路线提供新的证据。本文就此问题做一评述。

1 哈氏窝结构及功能

文昌鱼(*Branchiostoma*, *Amphioxus* 或 *Lancelet*)是代表现存脊索动物唯一生活的种类。文昌鱼哈氏窝(Hatschek's pit)似一个沟状结构,位于脊索右侧,实际上它也是轮器的部分,起源于外胚层^[3,4]。当时,Hatschek(1884)认为是感觉器官,多数学者认为它在文昌鱼摄食机制中起作用。Legros 进一步研究推测哈氏窝与脊椎动物脑垂体同源,但一直缺乏哈氏窝上皮细胞精细结构和生理生化方面的证据。近 20 年来,德国、瑞典、美国、日本和我国学者用透射电镜技术和免疫细胞化学及生殖生理学方法,研究了哈氏窝的精细结构及可能的内分泌功能,取得了重大的进展。

Tjoy 和 Welsch(1974)^[5]首先用电子显微镜技术详细观察到了哈氏窝是由 3 种细胞所组

成。他们发现位于哈氏窝基底部,一种上皮细胞胞质具有小泡和分泌颗粒,并推测该细胞有分泌功能。后来被 Sahlin 和 Olsson^[6]所证实。这是从发现哈氏窝以来,过了近一个世纪,这些学者为哈氏窝可能的功能提供了形态学依据,但仍未解决与脊椎动物脑垂体功能之间的关系。这个关系的研究是在我国两个实验室取得了突破。张致一及其同事^[7]用 PAP 免疫细胞化学方法,发现了哈氏窝上皮细胞对哺乳动物促黄体素(LH)抗体发生强的免疫阳性反应。另一是方永强及其同事^[8]将文昌鱼哈氏窝匀浆注射到雄性幼体黑眶蟾蜍体内可激发其精巢重量增加和精子发生及释精。他们分别证实了文昌鱼哈氏窝能够合成类似哺乳动物促性腺激素物质和这种物质的生理作用,并表明这种激素不具有种族的特异性。该结果为哈氏窝与脊椎动物脑垂体同源首先提供确凿的证据。最近, Nozaki 和 Gorbman^[9]用 ABC 法,方永强^[10]用免疫金银染色法分别发现了文昌鱼哈氏窝还能与人 LH 和 hCG 抗体,低等脊椎动物(鲤鱼和鲑鱼)促性腺激素抗体产生强免疫阳性反应,这就提示在文昌鱼哈氏窝所合成的促性腺激素物质的分子结构与鱼类和哺乳类有相当高的同源性,为促性腺激素的进化路线提供了重要的线索。可是, Sahlin^[11,12]采用荧光免疫技术却未能证实上述结果,她只发现哈氏窝对哺乳动物胃泌素(gastrin)和胆囊收缩素(CCK)抗体发生免疫阳性反应,她怀疑哈氏窝是一个内分泌器官。这种截然不同的结果,我们认为可能与研究者所取样品的性腺发育时期和采用方法不同有关。另一方面,方永强及其同事^[13]用透射电镜技术和生殖生理学方法,详细研究文昌鱼性腺发育不同时期哈氏窝上皮细胞的超微结构特点,发现了哈氏窝上皮细胞胞质分泌颗粒的数量与其性腺发育和成熟呈现正的相关性,在性腺发育早期,哈氏窝上皮细胞尚缺乏分泌颗粒,当卵母细胞开始合成卵黄颗粒时,这种细胞胞质中开始出现分泌颗粒,并随卵母细胞的进一步发育,分泌颗粒数量也随之增多,在成熟期达到高峰。值得指出的是,在成熟期哈氏窝上皮细胞对促性腺激素释放激素类似物(GnRH-A)发生应答反应,这一生理特性与脊椎动物脑垂体促性腺激素分泌细胞对 GnRH-A 的应答相一致。提示文昌鱼哈氏窝上皮细胞是 GnRH-A 的靶细胞,也是文昌鱼原始的促性腺激素分泌细胞。方永强和 Welsch 用 lectin 组织化学技术首次证明了文昌鱼哈氏窝上皮细胞分泌的脊椎动物促性腺激素样物质为一种含唾酸的糖蛋白激素^[14]。从而为哈氏窝的内分泌功能提供生理学证据。新近我们用免疫细胞化学方法^[15]还证实了原索动物尾索类海鞘神经腺上皮细胞对鲑鱼和哺乳动物促性腺激素抗体发生强免疫阳性反应。

上述研究结果为揭示脑垂体的起源提供重要的线索,即原始的脑垂体既是一种化学感受器,又是一种内分泌腺。原索动物海鞘和文昌鱼是原始脑垂体的代表,神经腺和哈氏窝与外界水流相通,直接感受外环境变化的刺激。到了圆口鱼和鱼类出现了鼻-垂体道^[16,17]。脑垂体由化学感受器为主要功能逐渐退居于次要地位,脑垂体成为控制脊椎动物生长发育、代谢和生殖活动的重要内分泌腺。

2 中枢神经系统的神经内分泌功能

文昌鱼中枢神经系统包括脑泡和脊髓。国外学者对该系统的解剖结构及功能已进行了一些初步的研究^[18,19],但有关它们与生殖神经内分泌的关系,迄今尚不明了。近几年来,一些学者用放射免疫测定法、高效液相色谱技术和免疫细胞化学方法均发现了脑泡的神经内分泌细胞能够产生一些重要的多肽激素和神经递质。这些物质很有可能参与调控文昌鱼的性腺发育和成熟。

(1) 文昌鱼促黄体素释放素或促性腺激素释放素(LH-RH 或 GnRH)的周年变化。张致

一等^[20]在文昌鱼哈氏窝上皮细胞基部曾观察到 LH-RH 免疫阳性颗粒。但 LH-RH 与文昌鱼性腺发育之间的关系,一直未得到进一步的研究。另一学者^[21]用放射免疫测定法发现了文昌鱼体内 LH-RH 含量的周年变化与性腺发育和生殖指数相一致(表 1,2)。

表 1 文昌鱼性腺发育的周年变化

日期/月	动物数量		雌性腺发育时期						雄性腺发育时期						海水 温度(℃)
	雌	雄	0~Ⅰ	%	Ⅱ~Ⅲ	%	Ⅳ~Ⅴ	%	0~Ⅰ	%	Ⅱ~Ⅲ	%	Ⅳ~Ⅴ	%	
1	505	753	395	78.2	110	21.8	0	0	395	52.5	358	47.5	0	0	13.45
2	432	491	236	54.6	196	45.4	0	0	235	47.9	256	52.1	0	0	15.45
3	442	569	212	48.0	230	52.0	0	0	211	37.1	358	62.9	0	0	15.63
4	528	524	217	41.1	311	58.9	0	0	216	41.2	308	58.8	0	0	20.17
5	546	608	112	20.5	269	49.3	165	30.2	111	18.3	308	50.6	189	31.1	23.0
6	504	621	0	0	220	43.7	284	56.3	0	0	230	37.0	391	63.0	25.97
7	496	574	0	0	342	68.9	154	31.1	0	0	200	34.8	374	65.2	29.50
8	492	690	61	12.4	297	60.4	134	27.2	61	8.8	395	57.2	234	34	30.0
9	482	573	283	58.7	197	40.9	2	0.4	283	49.4	286	49.9	4	0.7	28.6
10	495	563	290	78.8	105	21.2	0	0	389	69.1	174	30.9	0	0	25.5
11	511	535	367	70.8	149	29.2	0	0	362	67.7	173	37.3	0	0	19.37
12	476	454	309	64.9	167	35.1	0	0	308	67.8	146	32.2	0	0	16.02

表 2 文昌鱼生殖指数的周年变化*

日期/月	体重(g)	雌性生殖指数	体重(g)	雄性生殖指数
	平均值±标准误差		平均值±标准误差	
1	0.26±0.05	10.5±0.02	0.22±0.10	8.7±0.02
2	0.26±0.06	11.0±0.02	0.24±0.07	9.25±0.02
3	0.26±0.10	13.0±0.05	0.25±0.07	11.0±0.03
4	0.27±0.06	13.5±0.03	0.27±0.06	13.0±0.06
5	0.30±0.08	17.5±0.05	0.28±0.01	18.0±0.04
6	0.31±0.12	21.5±0.04	0.30±0.10	22.1±0.02
7	0.30±0.07	16.5±0.07	0.27±0.04	18.5±0.02
8	0.24±0.06	14.0±0.03	0.27±0.04	14±0.025
9	0.24±0.07	10.6±0.04	0.25±0.08	11±0.03
10	0.22±0.07	8.3±0.03	0.25±0.06	7.7±0.03
11	0.22±0.05	8.5±0.02	0.26±0.06	8.4±0.03
12	0.25±0.06	6.4±0.03	0.25±0.07	7.9±0.03

* 每月雌、雄动物均为 40 尾。

从表中看出:1)每年 5~7 月为厦门文昌鱼繁殖季节,6 月为繁殖盛期。2)雌、雄文昌鱼体内 LH-RH 含量在 5 月开始上升,在雌性约为(66.89±5.62)ng/尾,6 月为(158.17±3.17)ng/尾,7 月为(65.16±0.25)ng/尾;在雄性则为(53.27±0.36),(60.15±0.31)和(58.80±

0.11)ng/尾。这些数据表明雌、雄文昌鱼性腺周期,生殖指数周年变化与 LH-RH 含量的变化相一致,并且还表明雌、雄文昌鱼 LH-RH 周年含量变化有所不同。雄性在 4 月 LH-RH 水平开始上升,早于雌性,在整个生殖季节,维持较恒定水平,而雌性则出现一个 LH-RH 的高峰期(图 1)。提示雄性动物精巢发育成熟的激素调控有别于雌性动物。3) 在生殖季节,雌性文昌鱼 LH-RH 含量比非繁殖季节约高 2~5 倍,而雄性约高 2~3 倍。另外,十分有趣的是,文昌鱼各部,包括头部、身体中部和尾部以及性腺(卵巢和精巢)都存在有 LH-RH,但唯有头部(脑泡和哈氏窝)的 LH-RH 含量随性腺发育而上升,性成熟期达高峰。在雌性为 0.003 25ng/10 尾头部,雄性 0.002 48ng/10 尾头部,约比未成熟期高 4~5 倍。同时,精巢和卵巢中 LH-RH 含量随性腺成熟达最大值。这里,尤其要指出的是文昌鱼脑泡中 LH-RH 水平与性腺发育成熟的相关性与鱼类^[22]下丘脑 LH-RH 水平变化相一致,这就表明文昌鱼体内 LH-RH 的生理作用与鱼类相似。

另一方面,张崇理及其同事^[23]用放射免疫测定法和高压液相层析技术发现了文昌鱼体内有两种类型 GnRH,一种属鲑鱼(sGnRH),另一种属哺乳类(mGnRH),殷红等^[24]进一步研究文昌鱼在排精卵前后性腺中 GnRH 含量变化,结果发现卵巢中含有较高的 mGnRH 和较低含量 sGnRH,并提出 mGnRH 在文昌鱼性腺发育及生殖活动中可能起更重要的作用。根据神经肽的进化研究表明^[25],文昌鱼体内存在两种类型 GnRH,将为 GnRH 家族的进化过程提供新的思路。

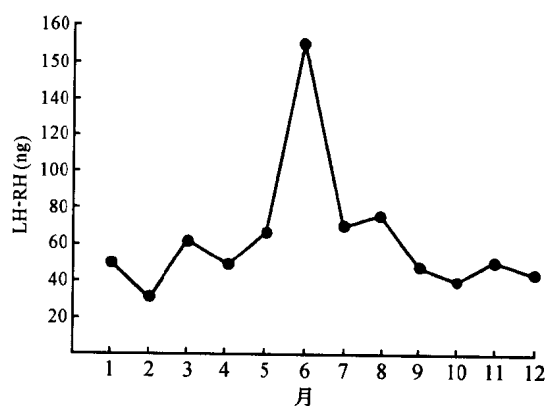


图 1 雌文昌鱼 LH-RH 的周年变化

此外,免疫细胞化学和生殖生理学的研究表明,文昌鱼中枢神经系统广泛分布着 GnRH 免疫阳性细胞。从文昌鱼头部提取 GnRH 物质,可有效地促进幼体蟾蜍的生精活动^[26]。

(2) 脑泡神经肽与神经递质。国内外学者用免疫细胞化学和高压液相色谱均一致证实文昌鱼脑泡中存在多种神经肽和神经递质。现已查明的有生长抑素(SST)^[27]、血管活性肠肽(VIP)^[28]和钙调素^[29];神经递质有:5-羟色胺(5-HT)^[30,31]、去甲肾上腺素(NE)和多巴胺(DA)^[32]。因此,文昌鱼脑泡中所存在这些神经肽和神经递质具有重要的生理学意义。1) 这些物质可能参与文昌鱼排卵和协调其生殖活动。因为研究证实在排卵前文昌鱼体内 LH-RH、NE 和 DA 的水平都有非常明显的升高,排卵后下降^[24,32]。而 5-HT 和钙调素很可能像脊椎动物那样参与协调文昌鱼生殖活动。2) 文昌鱼脑泡起着类似生殖调控中枢的作用。理由是文昌鱼脑泡中所产生的这些物质与脊椎动物下丘脑神经内分泌细胞所产生物质十分类似。众所周知,脊椎动物下丘脑是脊椎动物生殖内分泌调控轴的重要组成部分,是生殖调控中枢。因而可以认为文昌鱼虽然没有象脊椎动物那样具有分化的下丘脑,但脑泡中已有特化神经内分泌细胞,其生理功能与脊椎动物下丘脑相似,并组成文昌鱼原始的生殖内分泌调控轴的主要部分。

3 性腺的内分泌功能

脊椎动物性腺(卵巢和睾丸),既是生殖器官,又是内分泌组织。它们分泌性类固醇激素,

包括雄激素、雌激素和孕激素。这些激素对调控脊椎动物的性腺发育和成熟,维持副性征和性行为起着十分重要的作用。

文昌鱼性腺是否存在性类固醇激素,以及这些激素是由性腺哪种细胞产生的,长期以来,一直持否定看法。Guraya 较长时期研究文昌鱼性腺结构和功能,他认为文昌鱼的性腺不可能合成性类固醇激素,也没有类固醇激素生成细胞^[33~35],其根据是文昌鱼性腺缺乏生殖管。然而,张致一及其同事^[36]首先应用放射免疫测定法,发现了性成熟期卵巢和精巢中存在着雌激素、雄激素和孕激素。同时,还研究证实性腺中类固醇激素的合成和分泌,像脊椎动物一样,受蛋白质激素和多肽释放激素的调节,例如,给性成熟雌、雄文昌鱼体内注射 LHRH-A,使雌性动物孕酮增加 7 倍,雌二醇增加 4 倍,给予人绒毛膜促性腺激素也明显增加孕酮水平。在雄性,则引起睾酮水平提高,但 LHRH-A 刺激睾酮生成比 HCG 更有效。然而,张致一等的研究仅说明性类固醇激素参与性腺成熟,但仍未阐明性类固醇激素在文昌鱼性腺发育整个过程中的生理作用。方永强及其同事^[37]发现了文昌鱼小生长期的卵巢和精巢中 17 β -雌二醇,睾酮和孕酮水平上升,并持续到大生长中期,尔后下降(图 2, 3),提示性类固醇激素参与卵黄生成和精子发生过程。要问,雌、雄文昌鱼性腺中存在性类固醇激素是由哪种细胞产生?从 1903 年 Neidert 和 Leiber^[38]描述了文昌鱼性腺的解剖结构以来,一直到 80 年代,虽然各国学者^[33~35, 38~43]报道了文昌鱼精子发生和卵子发生以及卵母细胞发育和卵黄生成,但很少知道文昌鱼性腺中是否存在非生殖细胞,即类似脊椎动物精巢中能够产生性类固醇激素的 Sertoli 细胞和间质细胞,卵巢中的滤泡细胞。方永强^[44]首先在文昌鱼精巢 Sertoli 细胞的超微结构研究中提出了 Sertoli 细胞可能是合成性类固醇激素的细胞,该细胞具有现在已被公认的一类固醇激素合成细胞三个主要的特征,即滑面内质网、脂滴和管状线粒体^[44, 45],这一看法被 Holland^[46]所证实。国外,Callard 等^[47]发现了在离体条件下,文昌鱼精巢组织能将雄激素转换成雌激素,进一步提供生化方面的证据。关于文昌鱼卵巢是否存在滤泡细胞(非生殖细胞),Holland 等^[48]和方永强等^[49]分别报道了文昌鱼大生长时期和成熟期卵巢中存在着滤泡细胞,Holland 等还推测文昌鱼滤泡细胞在去除第一次成熟分裂前期的抑制和启动卵母细胞成熟和排卵有重要的作用。最近方永强和 Welsch^[50]用电镜技术详细观察了滤泡细胞在卵子发生过程中不同形态变化,找到了滤泡细胞是雌性文昌鱼类固醇激素生成细胞的可能证据。这是:1) 有圆形或椭圆形管状线粒体,2) 滑面内质网,3) 脂滴,4) 可见胞质中有类固醇激素的分泌颗粒。尤其要指出的是在卵巢发育的 4~5 期,在滤泡细胞胞质中可见发达的微丝和引起滤泡细胞收缩的物质,肌动蛋白和肌球蛋白,从而表明文昌鱼滤泡细胞在不同发育时期具有不同功能,即在卵母细胞发育和成熟时期产生和分泌性类固醇激素,在最后诱发排卵中起着重要的作用。同时还发现不同成分的碳水化合物参与卵母细胞的发育和成熟^[51]。

上述实验表明,文昌鱼中枢神经系统,尤其是脑泡和哈

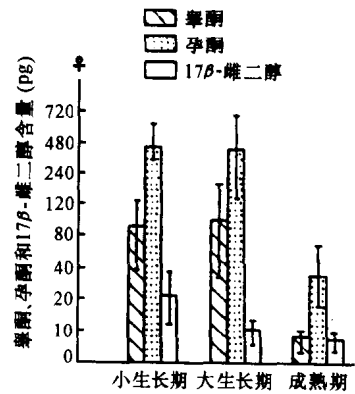


图 2 雌文昌鱼在不同发育时期类固醇激素含量的变化

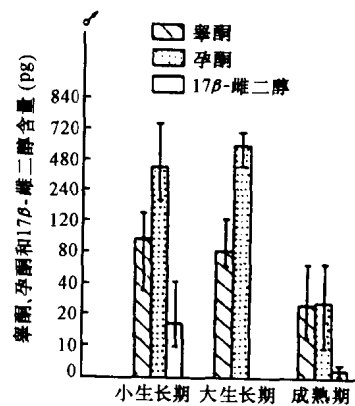


图 3 雄文昌鱼在不同发育时期类固醇激素含量的变化

氏窝以及性腺所分泌的生殖激素,在调控文昌鱼性腺(精巢和卵巢)发育和成熟的生理作用可与脊椎动物的下丘脑、脑垂体和性腺相比拟。因此,我们提出文昌鱼存在着原始的生殖内分泌调控轴,这就是脑泡-哈氏窝-性腺轴,从而进一步证实了张致一^[20]首先提出文昌鱼具有生殖激素调控系统的假说。为生殖内分泌的演化路线提供新的思路,开拓了文昌鱼生殖内分泌学研究的新领域,确定了文昌鱼在生殖内分泌进化中的地位。

4 外源性激素对文昌鱼性腺发育和成熟的影响

生殖内分泌研究表明,用外源性激素处理动物,观察其对性腺发育和生殖活动的影响,是验证文昌鱼确实存在原始的生殖内分泌调控轴的客观指标。方永强及其同事^[52~57]用促性腺激素释放素类似物(GnRH-A)来处理性腺发育不同时期的文昌鱼,包括性腺尚未发育,发育的卵巢和精巢以及成熟的性腺。结果发现 GnRH-A 可始动文昌鱼提早性腺发育,促进卵巢和精巢的发育和成熟以及诱发文昌鱼产卵和释精。对照组与实验相差异十分显著($P < 0.01$)。GnRH-A 的作用机制研究表明,GnRH-A 可能通过激发卵巢产生性类固醇激素,而后促进卵母细胞发育成熟,因为放射免疫测定证实 GnRH-A 可诱发卵巢中孕酮、睾酮和 17β -雌二醇的含量比对照组增加 1~3 倍。另一方面,哺乳动物促性腺激素(FSH 和 HCG)还可诱发文昌鱼卵母细胞成熟和产卵,并呈现剂量与反应曲线正的相关性。实验组诱发卵母细胞成熟达 86.9% 而对照组则为 58.0%,两者差异十分显著。另外,像在鱼类所证实的那样^[58~60],性类固醇激素,如 17α -甲基睾酮可激发文昌鱼精子发生。此外,文昌鱼像脊椎动物一样,光照周期可影响其性腺发育成熟和产卵或释精。研究结果表明^[61,62],长光照(16L:8D)不利于文昌鱼产卵,而短光照(8L:16D)则有利于产卵及其生殖活动。海水温度在 20~24℃ 是文昌鱼性腺发育和产卵的最适温度^[63]。这些事实充分说明文昌鱼存在着生殖内分泌调控系统(轴)的可靠性以及与脊椎动物的相似性及其亲缘关系。

综上所述,我们提出文昌鱼性腺发育的神经内分泌调控图解(图 4)。从图解看出,外界因子(水温、光照、化学因子等),通过皮肤感受器刺激神经系统(主要是脑泡)释放 GnRH 或神经递质, GnRH 有两种可能的作用方式,一是促使哈氏窝分泌促性腺激素(GTH),另一是直接作用于性腺。然后,GTH 和 GnRH 激发性腺(精巢和卵巢)合成和分泌性类固醇激素,趋动文昌鱼性腺发育和成熟。另外,性类固醇激素对脑泡和哈氏窝是否行使反馈作用,尚未定论。

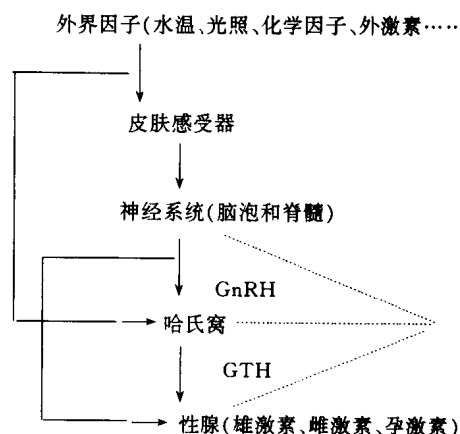


图 4 文昌鱼性腺发育的神经内分泌调控图解
实线——肯定,虚线——未定

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号:39670104)资助项目。

参考文献

- 1 Pallas P S. *Limax lanceolatus*. descriptio limacis lanceolaris in spicilegia zoologica; quibus novae imprimus et obscurae animalium species iconibus, descriptionibus. Gottfried Augustus Lange (Berlin), 1774, (10): 19
- 2 Gans C, Saiff E. Bibliography of the Lancelet. *Israel J of Zool*, 1996, 42(supple): 315~442
- 3 Legros R. Développement de la cavité buccale de l'Amphioxus contribution à l'étude de la morphologie de la tête, II. Développement de la cavité buccale définitive et du velum, III. Considérations générales. *Arch Anat Microscopie*, 1898, 2: 1~43
- 4 Drach P. Embranchement des céphalocordes. *Traité de Zoologie Anatomie, Systématique, Biologie*, 1948, 11: 931~1037
- 5 Tjioy L T, Welsch U. Electron microscopical observations on Kolliker's and Hatschek's pit on the wheel organ in the head region of amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*). *Cell Tissue Res*, 1974, 153: 175~187
- 6 Sahlin K, Olsson R. The wheel organ and Hatschek's groove in the lancelet, *Branchiostoma lanceolatum* (Cephalochordata). *Acta Zoologica (Stockh)*, 1986, 67: 201~209
- 7 张致一, 朱益陶, 陈大元. 促黄体素(LH)在文昌鱼哈氏窝免疫细胞化学定位. *科学通报*, 1982, 27(15): 946~947
- 8 方永强, 王龙. 文昌鱼轮器哈氏窝匀浆对幼体蟾蜍睾丸发育的初步探讨. *实验生物学报*, 1984, 17: 115~117
- 9 Nozaki M, Gorbman A. The question of function homology of Hatschek's pit of amphioxus (*Branchiostoma belcheri*) and the vertebrate adenohypophysis. *Zool Sci*, 1992, 9: 387~395
- 10 方永强. 鱼类促性腺激素在文昌鱼哈氏窝免疫细胞化学定位. *科学通报*, 1993, 38(9): 340~342
- 11 Sahlin K. Gastrin/CCK-like immunoreactivity in Hatschek's groove of *Branchiostoma lanceolatum* (Cephalochordata). *Gen Comp Endocrinol*, 1988, 70(3): 436~441
- 12 Sahlin K, Olsson R. Hatschek's groove-An endocrine organ in *Branchiostoma lanceolatum*? *Gen Comp Endocrinol*, 1987, 66: 1
- 13 方永强, 齐襄. 文昌鱼哈氏窝上皮细胞超微结构的研究. *中国科学, B辑*, 1989, (6): 592~595
- 14 Fang Y Q, Welsch U. A lectin histochemical study on carbohydrate moieties of the gonadotropin-like substance in the epithelial cells of Hatschek's pit of *Branchiostoma belcheri*. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 1997, 51: 53~59
- 15 方永强, 林加涵, 黄威权. 皱瘤海鞘神经腺复合体与性腺发育的关系. *科学通报*, 1997, 42(6): 653~656
- 16 Fontaine M, Olivereau M. Some aspects of the organization and evolution of the vertebrate pituitary. *Amer Zool*, 1975, 15(suppl I): 61~75
- 17 Gorbman A. Review of factory origin and evolution of the brain-pituitary endocrine system: fact and speculation. *Gen Comp Endocrinol*, 1995, 97: 171~178
- 18 Fusari R. Beitrag zum studium des peripherischen nerven system von amphioxus lanceolatus. *Internat Monatssch Anat Physiol*. 1889, 6: 120~140
- 19 Bone Q. The central nervous system in amphioxus. *J Comp Neurol*, 1960, 115: 27~64
- 20 Zhang Z Y, Liu Y X, Zhu Y T. The reproductive endocrinology of amphioxus, In: Carlick D C, Roner P I eds. *Frontiers in Physiology Research*, Canberra: Australian Academy of Science, 1984, 79~83
- 21 方永强, 王红, 张崇理. 文昌鱼促黄体素释放素(LH-RH)的周年变化及其与性腺发育的相互关系. *中国科学, B辑*, 1990, (5): 503~509.
- 22 Gentile F, Lira O, Cotte D M. Relationship between brain gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and seasonal reproductive cycle of "Caribe colorado", *Pygocentrus natus*. *Gen Comp Endocrinol*, 1986, 64: 239~