

神經勝肽對鮑魚生殖的調控

許晉榮

水產試驗所海水繁養殖研究中心

前言

多細胞動物在接受到內、外環境刺激時，會經由中樞神經及內分泌系統分泌化學物質，作用在各器官、組織上，協調體內生理功能，維持衡定。不同於脊椎動物，在無脊椎動物，雖然在某些物種，如甲殼類或貝類，也具有傳統定義上的內分泌器官，但是神經內分泌系統 (neuroendocrine system) 才是這些動物主要的內分泌調節方式，所釋放的化學物質多來自神經組織內的神經內分泌細胞 (neurosecretory cell) (或器官) (盧，2008)。神經內分泌細胞所分泌的化學物質因化學組成與分子大小又可分為兩大類：一為勝肽類 (peptide)，稱之為神經勝肽 (neuropeptide)；另一類則是由小分子所構成，例如乙醯膽鹼 (acetylcholine)、單胺類 (monoamine)、谷胺酸 (glutamate) 等，稱為傳統神經傳遞物質 (classical neurotransmitter) (Ketata et al., 2008; Morishita et al., 2010)。

在水生動物，有關神經內分泌對魚類生殖調控的研究已較為透徹，在下視丘-腦下腺-性腺軸中各激素的結構、作用及調控多半也已明瞭。在軟體動物門 (phylum Mollusa)，有關神經內分泌對生殖調控的研究並不像在魚類那麼透徹，各神經激素的確認、組成、分布及彼此間的調控機制仍待釐清。鮑魚

(*Haliotis spp.*) 是軟體動物門，腹足綱 (class Gastropoda) 的重要經濟物種，近幾年在神經內分泌對生殖調控的研究頗有進展，因此本文將以之為題，說明目前已知的幾種神經勝肽對其生殖的調控。

鮑魚的神經系統

軟體動物屬於前口類動物 (protostomes)，其神經系統屬於神經節中央神經系統 (ganglionic central nervous system)，由許多神經節及連接神經連索 (connective) 所組成 (Wyse, 2004)，已有初步的頭化現象 (cephalization) (Withers, 1992)。以耳鮑 (*H. asinina*) 為例，牠在食道前端有一對腦神經節 (cerebral ganglion)，靠著腹側及背側的腦神經節連合 (cerebral commissure) 相連，腹側的腦神經節連合膨大形成一個口神經節 (buccal ganglion)。腦神經節向前分出神經到觸角、眼及頭前部，向後則各有一對腦側足神經連索 (cerebropleural connective) 及腦足神經連索 (cerebropedal connective)，它們會延伸到內臟團底部的陷窩中，癒合成四角形的側足神經節 (pleuropedal ganglion)。由內臟團又伸出臟神經索 (visceral cord) 和一對足神經索 (pedal nerve cord)。臟神經索以 8 字型扭轉圍繞著內臟團，在它後半端有一個

臟神經節 (visceral ganglion)，由這裡會派生神經到消化、生殖器官等內臟諸器官。足神經索分成左右兩索向後延伸，貫穿整個腹足，彼此間以足神經連合 (pedal cord commissure) 相連 (Upatham et al., 1998; 李等, 2004)。

神經內分泌細胞分布在軟體動物的各神經節中 (盧, 2008)，神經內分泌細胞所分泌化學物質不是經由神經軸突 (axon) 直接送到標的器官，就是經由血淋巴液運送 (Hartenstein, 2006)。研究人員利用電子顯微鏡及光學顯微鏡在鮑魚的各神經節中也發現神經分泌細胞 (Yahata, 1971; Hahn, 1994; Uptham et al., 1998; Kruatrachue et al., 1999)。在盤鮑 (*H. discus*)，某些神經分泌細胞對染劑 paraldehyde fuchsin 的染色強度會隨著季節變化，在性腺開始成熟時的 6 月開始增多，在 9 月達到最高 (Yahaha, 1971)。另外，將成熟盤鮑的內臟神經節與側足神經節的萃取液注射入未成熟的盤鮑體內，也會促進其卵巢發育；但是腦神經節的萃取液則無此現象 (八幡, 1973)。這些結果顯明，鮑魚的神經內分泌及分泌的化學物質的確與其性腺發育有密切的關係。

鮑魚的促性腺激素釋放激素

促性腺激素釋放素 (gonadotropin-releasing hormone, 以下簡稱 GnRH) 在脊椎動物腦內，大抵上分布在下視丘、間腦、嗅葉、端腦...等區域 (Norris, 1997)。目前至少已發現 28 種 GnRH 類型，並完成定序。其中，15 種來自脊椎動物，13 種來自無脊椎動

物。而在這 13 種無脊椎動物的 GnRH，又有 10 種來自與脊椎動物同屬脊索動物門 (phylum Chordata)，尾索動物亞門 (subphylum Urochordata) 的海鞘 (tunicate)；剩下 3 種則均來自軟體動物，包括腹足類的加州海兔 (*Aplysia californica*) 與頭足類的真蛸 (*Octopus vulgaris*) 及歐洲烏賊 (*Sepia officinalis*) (Tsai and Zhang, 2009; 于等, 2010; Morishita et al., 2010)。脊椎動物的 GnRH 源自一個激素原 (prohormone)，經過酵素切割後，成為 GnRH 與 GnRH 關聯勝肽 (GnRH-associated peptide)。脊椎動物及海鞘的 GnRH 都是由 10 個胺基酸組成 (表 1)，而且有其保守性，包括在第一位置的焦谷氨酸 (pyroglutamyl acid, pGlu)、第四的絲胺酸 (serine)、第九的脯胺酸 (proline) 及第十的甘胺酸 (glycine)。有意思的是，由軟體動物選殖到的 GnRH 却是由 12 個胺基酸組成。將它們的序列與脊索動物門的 GnRH 序列比對，可以發現，真蛸 (octGnRH) 及海兔的 GnRH (anGnRH) 似乎在第 2、3 位置插入了兩個胺基酸，這兩個胺基酸在這兩種動物都是天門冬胺酸 (asparagine) 及酪胺酸 (tyrosine)，至於焦谷氨酸、絲胺酸及甘胺酸的序列還是保守的；但是在 anGnRH 第 11 個胺基酸居然是丙胺酸 (alanine)，並不是脊索動物的脯胺酸 (Tsai and Zhang, 2009; 于等, 2010)。在脊椎動物，GnRH 會刺激促性腺激素 (gonadotropin) 分泌，促進性腺發育。octGnRH 不僅是在胺基酸序列和其他脊椎動物的激素有保守性，將其注入日本鶲鶴體內，還可以提高其黃體生成素 (luteinizing hormone) 分泌量，顯示其對促性腺激素的促

表 1 軟體動物與脊索動物促性腺激素釋放素蛋白質序列比較

GnRH/A.A.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
mGnRH	Glu	-	-	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly
cGnRH-I	Glu	-	-	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly
sGnRH	Glu	-	-	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly
lGnRH-III	Glu	-	-	His	Trp	Ser	His	Asp	Trp	Lys	Pro	Gly
tGnRH-II	Glu	-	-	His	Trp	Ser	Leu	Cys	His	Ala	Pro	Gly
octGnRH	Glu	Asn	Tyr	His	Phe	Ser	Asn	Gly	Trp	His	Pro	Gly
anGnRH	Glu	Asn	Tyr	His	Phe	Ser	Asn	Gly	Trp	Tyr	Ala	Gly

mGnRH：哺乳類；cGnRH-I：雞；sGnRH：虹鱒；lGnRH-III：八目鰻；tGnRH-II：海鞘；octGnRH：真蛸；anGnRH：海兔（資料取自 Takawa-Kuroda et al., 2002 及 Zhang et al., 2008）

進效果是和其它脊椎動物的 GnRH 相同的 (Iwakoshi et al., 2002)。

鮑魚的 GnRH 目前尚未被選殖或純化，不過使用免疫組織化學 (immunohistochemistry) 的方法倒是在鮑魚體內找到了免疫反應部位。Nuurai et al. (2010a) 利用兩種抗脊索動物 GnRH 的抗體：抗八目鰻 (lamprey) GnRH 抗體 (以下簡稱 anti-lGnRH-III) 及抗海鞘 GnRH 抗體 (anti-tGnRH)，在耳鮑的神經節及卵巢內都發現免疫反應。anti-lGnRH-III 主要表現在腦神經節及側足神經節的 1 型神經分泌細胞，及在腦神經節的少部分 2 型神經分泌細胞；anti-tGnRH 雖僅少量表現在這兩個神經節背側的 1 型神經分泌細胞，卻大量表現在兩個神經節間的神經纖維上。兩者在卵巢上的表現也不同，anti-lGnRH-III 主要表現在卵原細胞 (oogonia) 及第一期卵細胞 (oocyte)，anti-tGnRH 則表現在第一、二期卵細胞。這結果顯示，耳鮑不僅像在脊椎動物一樣，體

內至少存有兩種 GnRH，且分布區位也不同。另外，鮑魚的 GnRH 除了可能是神經激素外，經由突觸或淋巴液輸送到生殖腺外，它也可能由卵巢自行生成。Amano et al. (2010) 則使用抗小鼠 GnRH 抗體 (anti-mGnRH) 及抗雞 GnRH 抗體 (anti-cGnRH-II) 在皺紋盤鮑 (*H. discus hannii*) 神經系統與卵巢進行免疫組織化學搜尋。他們發現在腦神經節、足神經節、內臟神經等處都可以發現 anti-mGnRH 的反應；而 anti-cGnRH-II 則可在由腦神經節伸出的神經纖維發現。經由雙重染色免疫反應，顯示兩種 anti-GnRH 的免疫反應部位並不一致。更有意思的是，Amano et al. (2010) 利用高效液相層析儀 (HPLC) 分析由皺紋盤鮑的腦神經節萃取液，發現在萃取物中，主要的波峰析出時間與八目鰻的 lGnRH-II 析出時間幾乎相同，另外還有一個較小的波峰，其析出時間與真蛸的 octGnRH 析出時間相近，此同樣顯示在皺紋盤鮑的神經節中可能具有兩種 GnRH。不過 Amano et

al. (2010) 並沒有在皺紋盤鮑的卵巢發現任何 anti-GnRH 的免疫反應。

鮑魚的產卵激素

軟體動物體內與性腺成熟有關的神經勝肽還有產卵激素 (egg-laying hormone, 以下簡稱 ELH)。這個神經激素最早是在加州海兔腹神經節前方的囊細胞 (bag cell) 發現，ELH 激素原經酵素作用，切割成 36 個胺基酸的 ELH 及多個囊細胞勝肽 (bag cell peptide, BCP)。在加州海兔不論是活體 (*in vivo*) 或離體 (*in vitro*) 試驗，ELH 都可以促使其卵巢排卵。研究學者之後在沼澤椎實螺 (*Lymnaea stagnalis*) 腦神經節中的尾背細胞 (caudo-dorsal cell) 也發現了一種尾背細胞激素 (caudo-dorsal hormone, 以下簡稱 CDCH)，它同樣具有誘導該螺排卵的效果。CDCH 也是由激素原經酵素作用而成，作用後之產物除了 CDCH 外，還有多個尾背細胞勝肽 (caudo-dorsal peptide, CDCP) 與 calfluxin。ELH 與 CDCH 及 BCP 與 CDCP 在胺基酸的組成上各有 50–70%的相似性 (Morishita et al., 2010)。

Wang and Hanna (1998) 在黑唇鮑 (*H. rubra*) 體內也選殖出 ELH，稱之為 aELH。由其 DNA 鹼基對所推出的胺基酸序列與加州海兔的 ELH 及沼澤椎實螺的 CDCH 胺基酸序列比較顯示，aELH 與椎實螺的 CDCH 較接近，36 個胺基酸序列只有 1 個不同，有 97.2%的相似度；和海兔的 ELH 則有 21 個胺基酸的不同，僅有 41.7%的相似度。利用 aELH 合成蛋白注射在小鼠身上所產生的抗

體 (anti-aELH) 在黑唇鮑神經節及卵巢上進行免疫組織化學研究，發現在鮑的腦神經節、側足神經節及卵巢上都產生免疫反應 (Cummins et al., 2001)。利用 anti-aELH，Sationgdee et al. (2005) 同樣在耳鮑的腦神經節、側足神經節、內臟神經節及神經連索上的血竇發現免疫反應；anti-aELH 的免疫反應也在鄰近成熟卵細胞的濾泡及顆粒細胞，以及卵被膜及橫條結締組織 (trabeculae) 上被發現。這在在都顯示 ELH 除了在鮑魚的神經節上分泌外，也有可能由卵巢本身產生。

Nurrai et al. (2010b) 最近的實驗顯示，aELH 與 GnRH 對耳鮑的性腺發育與排精產卵調控有關。他們先對 4 個月的稚貝注射 20 及 200 ng/g BW 的 aELH、buserelin (哺乳類 GnRH 的類似物)、octGnRH 或 tGnRH，共 14 週。結果發現僅 aELH 有促進耳鮑性腺提早分化的趨勢，且較多是分化成雌性，幾種 GnRH 則無此效果；但是 octGnRH 或 tGnRH 對於稚貝的成長則有促進效果。接著，他們對性腺成熟度 (Visual gonad index, VGI) 第 1 級的 1 年雌貝注射 500 及 1,000 ng/g BW 的 aELH、buserelin、octGnRH 或 lGnRH-I，發現所有注射神經勝肽組的雌貝都在第 6 週達到性成熟並產卵，對照組則到第 8 週才達到性成熟。接下來，Nurrai et al. (2010b) 對性腺 VGI 已經成熟到第 3 級的成貝，注射不同劑量的 aELH (250、500、100 ng/g BW)、buserelin (500、100 ng/g BW) 與 1,000 ng/g BW 的 octGnRH。6–8 個小時後，成貝排精產卵的比例隨著 aELH 及 buserelin 劑量提高而增加，但是同屬軟體動物真蛸的 octGnRH 反而沒有明顯的促進效果。這些結果顯示，

特別報導

ELH 刺激鮑魚性腺成熟與排精產卵的效果似乎較 GnRH 直接；而不同 GnRH 在刺激性腺發育上的差異，則可能與生殖腺上不同 GnRH 受器 (receptor) 對不同 GnRH 的親合性有關。

其它的幾種神經勝肽

除了上述兩種神經激素外，在其他軟體動物具有生殖促進及調控的幾種神經勝肽目前也在鮑魚體內發現，例如 FMRFamide (Cummins et al., 2011)、APGWamide (Chansela et al., 2008, 2010)。Chansela et al. (2010) 發現 APGWamide 出現在耳鮑腦神經節及神經索中；但在生殖腺方面，僅在雄貝的性腺發現，在性成熟雌貝的性腺則無 (Chansela et al., 2008)。將 APGWamide 注射入雄貝，會刺激其排精，但卻無法刺激雌貝排卵，這顯示 APGWamide 可能在雄貝的性腺發育與機能上扮演重要角色，但對雌貝的性腺發育影響不大 (Chansela et al., 2008)。

最近，Kuanpradit et al. (2010) 在耳鮑外套膜腔背側，靠近排精產卵管道處，發現了一個釋放費洛蒙 (pheromone) 的器官-鰓下腺 (hypobranchial gland)。他們接著在浸泡耳鮑的海水及其外套膜的黏膜上發現 3 種費洛蒙 (Has-MAP-1、Has-MAP-2、Has-MAP-3)，其分子量分別為 9.9 KDa、6.2 KDa 及 12.5 KDa (Kuanpradit et al., 2011)。經由組織切片及原位核酸雜交法 (*in situ hybridization*) 染色發現，這些蛋白質不僅可在生殖腺、鰓下腺與鰓內發現，也在後足神經節及神經索上的神經分泌細胞發現。其中，Has-MAP-2 的

蛋白質序列與神經勝肽 schistosomin 相近，而 schistosomin 在沼澤椎實螺體內，則與生殖調控有關。這些費洛蒙是否像在魚類的賀爾蒙型費洛蒙 (hormonal pheromones) 的角色一樣，同時在體內 (激素) 及體外 (性費洛蒙) 調控生殖生理與行為，使得鮑魚能夠順利完成生殖過程，產下後代？仍待進一步的研究。

結語

目前在軟體動物的生殖調控，除了上述的神經勝肽外，還有很多的研究是尚待拓展的。以單胺類中的血清動素 (serotonin) 為例，在雙殼類，血清動素可以誘導牠們排出精、卵 (Matsutani and Nomura, 1982)。分泌血清動素的神經元與其受器在腹足類 (包括鮑魚) 的各神經節及多處器官內被發現。研究顯示，血清動素與生殖腺的肌肉收縮有關 (Panasophonkul et al., 2009)，而在鮑類注射血清動素的確也會促進其排精產卵 (Kabir et al., 2001)，顯然血清動素也參與了鮑魚生殖過程的調控。另外，軟體動物也具備生成睪丸酮 (testosterone)、雌二醇 (estradiol-17 β) 及黃體素 (progesterone) 等生殖固醇類 (cholesterol) 激素的能力 (Lafont and Mathieu, 2007)，這些生殖固醇類在鮑魚的生殖調控又扮演什麼角色？各生殖激素彼此間的調控又是如何？都是日後研究的重點。

註：建議閱讀文章

Morishita, F., Y. Fukukawa, O. Matsushita and H. Minakata (2010) Regulatory actions of neuropeptides and peptide hormones on the reproduction of molluscs. Can. J. Zool., 88: 825-845.