

海蟾夏眠的代谢生理研究*

林浩然

(广州中山大学生物系)

D. J. 兰德尔 E. 维兹索里 C. 德克斯伯克

(加拿大不列颠哥伦比亚大学动物系)

许多两栖的脊椎动物在干旱缺水或者食物不足时埋藏在泥土里休眠。例如,肺鱼能在泥茧里不取食与饮水而生存数年之久 (Delaney等, 1977); 生活在沙漠地带的两栖类能埋藏在沙土里数月以躲避干旱; 海蟾 (*Bufo marinus*) 能埋藏在沙里克服短时间的缺水, 而以露在空气中的鼠孔进行呼吸 (Boutilier等, 1979)。

海蟾在失水时, 经皮肤排出的二氧化碳减少; 但是, 失水而尚未埋藏在沙里的海蟾, 二氧化碳的总排出量仍维持原状, 因为肺呼吸增强, 大部分二氧化碳经过肺和口腔排出体外。埋藏在沙里夏眠的海蟾, 肺呼吸减弱, 血液中二氧化碳增加, pH 亦随之暂时降低。所以, 夏眠的海蟾, 血液的二氧化碳增加和肺呼吸减弱有关。但是, 处于活动状态的海蟾, 和其他脊椎动物一样, 血液中二氧化碳增加和肺呼吸的增强有密切联系。这表明在休眠期间二氧化碳对肺呼吸的调节作用为某种因素所改变。最近已经知道某些麻醉物对哺乳类的呼吸有明显的影 响。例如, 由二氧化碳引起狗的过度呼吸作用能为 β -内啡肽 (endorphin) 所抑制 (Moss 等, 1978)。

本研究的目的是了解海蟾在夏眠中代谢生理的主要变化。对正常给水的, 失水 24 小时的和埋藏在沙里夏眠的海蟾, 分别测定它们的耗氧量、二氧化碳排出量。动脉血的氧和二氧化碳分压, pH 以及血浆中内源麻醉物的活性; 这对埋藏在沙里夏眠的海蟾注射麻醉物的拮抗物——naloxone, 以了解麻醉物在夏眠中的作用。

一、材 料 和 方 法

试验用海蟾 (体重为 227—466 克) 共 25 只, 驯养在 $29^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 的潮湿条件下, 每周喂给牛肝两次。按照 Macintyre and Toews (1976) 的方法, 每只海蟾用 MS222 麻醉后在体动脉弓做一导管手术。导管长约 60—80 厘米, 以便取血样时不惊动海蟾。手术后至少静养 24 小时, 让海蟾完全复原后才开始试验。

海蟾置于完全密封的正方形有机玻璃呼吸室内 (容积为 $20 \times 20 \times 20$ 厘米), 温度保持 $29^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 以测定耗氧量 (MO_2) 和二氧化碳排出量 (MCO_2) 进行海蟾夏眠试验时, 呼吸室底部加入少许水, 然后在三分之二的容积放入经过消毒的细沙, 使底层的沙潮湿而上层的沙仍保持干燥; 由于温度较高而干旱, 失水的海蟾放入呼吸室内不久就用后肢挖掘而埋藏于沙

* 本文是中山大学林浩然 1980 年在加拿大不列颠哥伦比亚大学 (University of British Columbia) 进修期间和 D. J. 兰德尔教授合作的。

里,直到它们的腹部表面接触湿沙为止,而其鼻孔仍露于沙外以进行呼吸。

对正常给水的,失水24小时的和埋藏在沙里夏眠的海蟾都分别测定它们的 MO_2 , MCO_2 , 动脉血的 PHa , PaO_2 , PaCO_2 和血浆中麻醉物活性。取血样的顺序是:海蟾手术后休息至少一天,给以水分和保持其体表潮湿,取第一次血样分析做为试验前的正常值,停止给水,保持呼吸室干燥,使海蟾失水24小时,取第二次血样分析做为失水24小时的数值;让海蟾因高温与干燥失水而埋藏沙里夏眠,24小时后取第三次血样分析做为夏眠24小时后的数值。每次取血样0.5—1.0毫米。血样用 Radiometer PHM 71 型酸硷分析仪及有关的电极测定 PaO_2 , PaCO_2 和 PHa 。然后将血样离心而得到血浆样品,在每毫升血浆中加入 0.5 毫升 10% 的三氯醋酸进行去蛋白作用。去蛋白后的上清液立即用来测定麻醉物活性或暂时贮存于 -4°C 中以备用测定。麻醉物的测定是按照 Henderson 等的方法 (Henderson 等, 1972)。小白鼠的输精管悬浮于盛有 Krebs 液的 2 毫升器官浴槽内,温度保持 37°C ,并以 95% O_2 和 5% CO_2 充气。0.1 赫和 80—100 伏的矩形脉冲通过两个铂电极输送,使输精管纵向收缩。收缩反应通过转换器放大后记录下来。加入血浆样品后使收缩程度减弱(表现为收缩波峰的高度降低),然后根据甲硫胺酸脑啡肽(methionin enkephalin)的等级剂量所做的标准曲线而计算血浆样品中的麻醉物活性。每次测定后均在器官浴槽中加入 0.1—0.2 毫升的 0.4 毫克/毫升 Norcan, 通过其增强输精管的收缩而验证输精管收缩的减弱是由于血浆样品中含有的麻醉物所引起。

为确定 naloxone 的作用,通过导管对夏眠的海蟾每尾动脉注射 100 毫升 naloxone (溶于 0.5 毫升生理盐水)或 0.5 毫升生理盐水,并在注射前和注射后立即测定其 MO_2 和 MCO_2 。

二、主要结果

1. 动脉血的 PaO_2 , PaCO_2 和 PHa

动脉血的 PaO_2 , PaCO_2 和 pHa 测定结果列于表 1 中。

表 1 正常给水的、失水的和夏眠的海蟾动脉血的氧分压(PaO_2)、二氧化碳分压(PaCO_2)和 PHa

海 蟾 的 状 况	$\text{PaO}_2(\text{mmHg})$	$\text{PaCO}_2(\text{mmHg})$	PHa
正常给水的	101 ± 6	11.36 ± 0.56	7.81 ± 0.02
失水24小时的	89 ± 6	12.2 ± 0.09	7.80 ± 0.01
夏眠24小时的	$72 \pm 14^*$	$16.8 \pm 1.30^{**}$	7.71 ± 0.03

* 和正常给水的海蟾相比有显著差别, $P = < 0.05$

** 和正常给水的海蟾相比有非常显著差别, $P = < 0.01$

失水24小时的海蟾,动脉血的 PaO_2 , PaCO_2 和 PHa 都没有明显变化。进入夏眠后,由于肺呼吸减弱, PaO_2 降低而 PaCO_2 升高,但 PHa 的变化不明显。Boutilier 等(1979)报道的海蟾在夏眠开始时暂时的呼吸酸中毒现象在这里并没有观察到,很可能是在我们取血样之前曾短暂出现过。

2. 耗氧量 (MO_2)、二氧化碳排出量 (MCO_2) 和血浆中麻醉物活性

MO_2 , MCO_2 和血浆中麻醉物活性的测定结果列于表 2 中。

表 2 正常给水的、失水的和夏眠的海蟾的耗氧量(MO_2)二氧化碳排出量(MCO_2)和血浆中麻醉物活性

海 蟾 的 状 况	MO_2 (ml/g/h)	MCO_2 (ml/g/h)	麻 醉 物 活 性 (mg/ml plasma)
正常给水的	0.0649 ± 0.005	0.0398 ± 0.002	8.61 ± 1.65
失水24小时的	$0.0506 \pm 0.005^*$	0.0359 ± 0.004	8.00 ± 1.77
夏眠24小时的	$0.0435 \pm 0.005^*$	$0.0295 \pm 0.003^*$	$19.40 \pm 2.53^*$

* 和正常给水的海蟾相比有非常显著差别 $P=0.01$ 。

失水24小时的海蟾, MO_2 降低22%, MCO_2 略为减少。进入夏眠后, MO_2 和 MCO_2 分别降低33%和26%。

海蟾失水24小时后对血浆中麻醉物的活性没有影响, 但进入夏眠后, 血浆中麻醉物的活性急剧增加, 为正常水平的 225%。由此可见, 海蟾的夏眠和血液循环中麻醉物的增加有密切联系。

目前还不能确定在海蟾血浆中测定的麻醉物是属于那一类。但它们即不是在血液中很快被分解破坏的脑啡肽 (enkephalin) 亦不是较大分子的鸦片物质, 如 β -MSH, 因为经过二氯醋酸处理后它们都被清除掉 (Hughes等, 1978)。小白鼠的输精管对各种麻醉物有不同的敏感性。根据 Hughes等 (1980), 输精管具有对 β -内啡肽特别敏感的受体, 它们对脑啡肽和 dermorphin 的亲和力低。因此, 在海蟾血液中测定的麻醉物很可能是 β -内啡肽。

3. 对夏眠海蟾注射naloxone后的 MO_2 和 MCO_2

对夏眠海蟾分别注射生理盐水和 naloxone 后 MO_2 和 MCO_2 的变化列于表 3 中。

表 3 对夏眠海蟾注射naloxone后的 MO_2 和 MCO_2

海 蟾 的 状 况	MO_2 (ml/g/h)	MCO_2 (ml/g/h)
正常夏眠的	0.0432 ± 0.002	0.0256 ± 0.003
夏眠+注射生理盐水	$0.0572 \pm 0.002^*$	$0.0324 \pm 0.004^*$
夏眠+注射	$0.1010 \pm 0.106^{**}$	$0.0532 \pm 0.010^{***}$

* 和正常夏眠的海蟾相比有显著差别 $P=0.05$

** 和正常夏眠的海蟾相比有非常显著差别, $P=0.001$

夏眠海蟾每尾动脉注射 0.5 毫升生理盐水后只引起轻微惊动而使 MO_2 和 MCO_2 略为升高。但是, 动脉注射 100 毫克 naloxone 后, 夏眠的海蟾在几分钟内迅速苏醒, 处于十分活跃的状态, MO_2 和 MCO_2 都明显增加。苏醒的海蟾得到水分后, 能正常生活。这证明麻醉物的拮抗物——naloxone能使夏眠的海蟾苏醒。

三、讨 论

海蟾失水24小时后主要的生理变化是耗氧量减少22%左右。Seymour (1973) 报道北美锄足蟾 (*Scaphiopus*) 在准备夏眠时和 Malan (1978) 报道一些哺乳类准备冬眠时亦有类似的降低代谢水平的变化。Snapp和 Heller (1980) 认为血液的酸中毒状态是使冬眠动物代谢水平降低

原因之一。海蟾在夏眠开始时有短暂的酸中毒现象,这是由于肺呼吸减弱所引起 (Boutilier 等, 1979); 而失水本身并不会使身体的 pH 降低。所以,我们观察的和失水有联系的代谢水平降低,不会是 pH 的变化所引起,因为 pH 的明显变化是在海蟾开始夏眠后才发生。因此,海蟾失水后引起需氧代谢降低,其调节机制还有待研究。

麻醉物很可能在脊椎动物休眠状态的生理调节中起某种作用。因为海蟾在夏眠时血液循环中的麻醉物活性增加,而注射麻醉物的拮抗物 naloxone 使夏眠的海蟾和冬眠的仓鼠苏醒 (Margules 等, 1979)。麻醉物的确切作用还不清楚。但是,很明显,它们如果不参与诱导夏眠的开始,亦是保持夏眠状态所必须的因素。由于需氧代谢的降低和血液循环中的麻醉物无关,它们很可能在休眠期间影响肺呼吸对血液 CO_2 含量的敏感性。此外,麻醉物能降低海蟾对外界刺激的敏感性,因为哺乳类的研究已经证明麻醉物能降低神经原活性并有明显的镇痛作用 (Miller 等, 1979)。

麻醉物对两栖类的作用还研究很少。但是,两栖类夏眠的生理状况和内源麻醉物对哺乳类的作用之间有许多相似之处。两栖类夏眠时不取食,利用体内贮存的脂肪 (Seymour, 1973); 不排尿,通过大膀胱重新吸收水分以保持正常的体液 (Shoemaker 等, 1977)。在哺乳类,麻醉物对降低消化道的活动性和保持身体的水分都起重要作用 (Hughes, 1981; Margules, 1979)。 β -内啡肽还能促进抗利尿激素和催乳激素的释放,而这两种激素的主要作用是减少尿的形成与调节体液的渗透压。所以,夏眠时海蟾血液中出现大量麻醉物很可能是综合的调节身体的生理状况,以适应不良的环境条件。

根据我们的研究结果,血液的酸中毒和我们所测定的麻醉物 (很可能是内啡肽) 都和诱导夏眠的开始没有关系。但是,这并不排除另外一些内源麻醉物诱导海蟾进入夏眠状态的可能性。已经知道两栖类的皮肤含有许多种很活耀的肽,其中有些 (如 bombasins 和 alytesins) 能促进脑垂体激素和内啡肽的释放 (Rivier 等, 1978)。值得注意的是最近从巴西蛙 (*Phyllomedusa sauvagii*) 的皮肤分离出一种高效能的麻醉物 dermorphin (Montecucchi 等, 1981); 它在空气湿度降低时释放,并且很可能诱发一系列反应而使身体进入夏眠状态。

参 考 文 献

- Boutilier, R. G., D. J., Randall, G. Shelton, and D. P. Toews 1979 Acid-base relationships in the blood of the toad, *Bufo marinus*.
1. The effects of environmental CO_2
 2. The effects of dehydration.
 3. The effects of burrowing.
- J. exp. Biol.* 82:331—365.
- Delaney, R. G. and A. P. Fishman 1977 Analysis of lung ventilation in the aestivating lungfish, *Protopterus aethiopicus*. *Amer. J. Physiol.* 233:R181—R187.
- Henderson, G., J. Hughes and H. W. Kosterlitz 1972 A new example of a morphin sensitive neuro-effector Junction; adrenergic transmission in the mouse vas deferens. *Brit. J. Pharmacol.* 46:764—766.
- Hughes, J., S. H. Snyder and F. E. Bloom 1978 Endorphins and Enkephalins. *Neurosciences Res. Prog. Bull.* 16(2):231—235.
- Hughes, J., A. Beaumont, J. A. Fuentes, B. Malfroy and C. Unsworth 1980 Opioid peptides: Aspects of their origin, release and metabolism. *J. exp. Biol.* 89:239—255.
- Hughes, J. 1981 Peripheral opiate receptor. mechanism. *Trends pharmacol Sci.* 2:21—24.
- Macintyre, D. H. and D. P. Toews 1976 The mechanism of lung ventilation and the effects of hypercapnia on respiration in *Bufo marinus*. *Can. J. Zool.* 54:1364—1374.

- Malan, A. 1978 Hibernation as a model for studies on thermogenesis and its control. *Experientia Suppl.* 32:303—314.
- Margules, D. L. 1979 Beta-endorphin and Endoloxone: Hormones of the autonomic nervous system for the conservation or expenditure of bodily resources and energy in anticipation of famine or feast. *Neuroscience & Behavioral Reviews*. 3: 155—162.
- Margules, D. L., B. Goldman and A. Finck 1979 Hibernation: and opioip dependent state? *Brain Res. Bull.* 4:721—724.
- Miller, R. J. and P. Cuatrecasas 1979 Neurobiology and Neuropharmacology of enkephalins. *Adv. Biochem. Psychopharm.* 187—226.
- Montecucchi, P. C., R. Castiglione, S. Piani, L. Gozzini and V. Erspamer 1981 Amino acid composition and sequence of Dermorphin, a novel opiate-like peptide from the skin of *Phyllomedusa sauvagi*. *International J. Peptide Protein Res.* 17:275—283.
- Moss, I. R. and E. Frieman 1978 Endorphin: effects on respiratory regulation. *Life Sci.* 23:1271—1276.
- Rivier, C., J. Rivier and W. Vale 1978 The effects of bombasin and related peptides on the prolactin and growth hormone secretion in the rat. *Endocrinol.* 102:519—522.
- Seymour, R. S. 1973 Energy metabolism of dormant spadefoot toads (*Scaphiopus*). *Copeia*. 3:436—445.
- Shoemaker, V. H. and K. A. Nagy 1977 Osmoregulation in amphibians and reptiles. *Ann. Rev. Physiol.* 39:449—471.
- Snapp, B. D. and H. C. Heller 1980 Suppression of metabolism during entrance into hibernation. *Fed. Proc* 39(3):1181.

PHYSIOLOGICAL STUDIES OF THE METABOLISM OF AESTIVATION IN THE TOAD, *BUFO MARINUS*

Lin Haoren

(Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou)

D. J. Randall E. Vizsolyi C. Daxboeck

(Department of Zoology, University of British Columbia, Vancouver, B. C., Canada)

Oxygen uptake, CO₂ elimination, blood gas tensions and pH of the hydrated, 24 hrs water-deprived and aestivated toad, *Bufo marinus* were measured, and plasma samples from same specimens were assayed on the vas deferens of mice for opiate activity. Following 24 hrs of water deprivation, oxygen uptake decreased by 22%, CO₂ elimination and oxygen tensions of blood were slightly reduced, and plasma opiate activity remained unaltered. Aestivation resulted in an increase of plasma opiate activity to 225% of the control hydrated levels, oxygen uptake, CO₂ elimination and oxygen tension of blood were further reduced, while blood CO₂ pressure increased sharply. The opiate antagonist—naloxone injections (100 mg per animal) caused a rapid arousal of aestivated toads and oxygen uptake and CO₂ elimination increased markedly. The results indicate that a reduction in aerobic metabolism is the first major shift in preparing for aestivation. Endogenous opiates appear to be involved in the maintenance, but not in the inception of aestivation.