

南方鲇两种生长激素受体的结构分析及其组织分布和激素调节*

章力** 黄希贵** 焦保卫 吴风瑞 王德寿***

三峡库区生态环境教育部重点实验室 水产科学重庆市市级重点实验室 西南大学生命科学学院, 重庆 400715

摘要 采用生物信息学方法, 从东方鲈 (*Fugu rubripes*) 基因组中分离出两种不同基因编码的 GHR1 (fGHR1) 和 GHR2 (fGHR2)。随后设计引物, 采用 RT-PCR 和 SmartTM Race 相结合的方法从南方鲇 (*Silurus meridionalis*) 肝脏中克隆出两种不同基因编码的生长激素受体, 即 GHR1 (scGHR1) 和 GHR2 (scGHR2) cDNA, 其全长分别为 1 985 bp (编码 602 个氨基酸) 和 2 300 bp (编码 553 个氨基酸)。这两种受体都含有生长激素受体典型的标志性基序 FGDFS, 以及细胞内属于细胞因子受体家族共有的 Box1 和 Box2 序列框。同时两者又存在差异, 表现在胞外半胱氨酸残基和胞内酪氨酸残基数目的不同。采用半定量 RT-PCR 方法研究了 scGHR1 和 scGHR2 在南方鲇各组织中表达量的差异, 结果表明: scGHR1 和 scGHR2 有广泛的组织分布, 在肝脏中两者的表达量最高。用 17 β -雌二醇 (E2)、17 α -甲基睾酮 (MT) 和可的松 (cortisol) 对南方鲇进行药物处理, 结果表明 E2 能够下调肝脏 scGHR1 和 scGHR2 mRNA 水平, 而 MT 上调 scGHR1 和 scGHR2 mRNA 水平。同时, 经 cortisol 处理后 scGHR1 mRNA 表达水平上升, 而 scGHR2 mRNA 表达水平不变 [动物学报 52 (6): 1096–1106, 2006]。

关键词 南方鲇 生长激素受体 结构分析 组织分布 激素调节

The structure analysis, tissue distribution and hormonal regulation of two distinct growth hormone receptors in southern catfish *Silurus meridionalis**

ZHANG Li**, HUANG Xi-Gui**, JIAO Bao-Wei, WU Feng-Rui, WANG De-Shou***

Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, Key Laboratory of Aquatic Science of Chongqing, School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract Two genomic contigs of putative growth hormone receptors (fGHR1 and fGHR2) were identified in the fugu *Fugu rubripes* genome by *in silico* analysis, suggesting the presence of two GHR types in a single teleost species. We validated this hypothesis by cloning the cDNA sequences of GHR1 (scGHR1) and GHR2 (scGHR2) from liver of the Southern catfish *Silurus meridionalis* by RT-PCR and SmartTM Race. The full-length cDNAs of scGHR1 and scGHR2 are 1 985 bp and 2 300 bp, encoding putative proteins of 602 and 553 amino acids, respectively. Both scGHR1 and scGHR2 have the characteristic landmarks of conventional GHR including the ligand binding motif FGDFS in the extracellular domain and conserved cytoplasmic Box1 and Box2 regions. However, they possess features that are distinctly different from each other. Firstly, the number of extracellular cysteine residues is different. While scGHR1 possesses 7 extracellular cysteine residues forming three disulfide bonds, scGHR2 has only 4 that may form two disulfide bonds. Secondly,

2006-06-27 收稿, 2006-10-09 接受

* 教育部重点项目 (No.2004-104161) 和重庆市科委自然科学基金 (No.CSTC2004BB8450) [This research was funded by the grants from the Leading Program of State Education Ministry (No.2004-104161) and the Chongqing Nature Science Foundation (No.CSTC2004BB8450)]

** 第一、二作者同等贡献 (The first two authors contribute equally to this work)

*** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: wdeshou@swu.edu.cn

© 2006 动物学报 Acta Zoologica Sinica

the number of intracellular tyrosine residues is different. The scGHR1 contains 8 tyrosine residues, but scGHR2 contains only 5. The expressions of scGHR1 and scGHR2 in different tissues of the Southern catfish were further examined using semi-quantitative RT-PCR. Results showed that scGHR1 and scGHR2 were present in all the tissues examined and that expression of scGHR1 and scGHR2 in liver were higher than in other tissues. *In vivo* hormonal regulation data indicated that hepatic scGHR1 and scGHR2 mRNA levels were downregulated by 17β -estradiol and upregulated by 17α -methyltestosterone. On the other hand, cortisol upregulated the hepatic scGHR1 mRNA level, but had no effect on levels of scGHR2 mRNA [*Acta Zoologica Sinica* 52 (6): 1096–1106, 2006].

Key words Southern catfish, *Silurus meridionalis*, Growth hormone receptor, Structure analysis, Tissue distribution, Hormonal regulation

生长激素 (Growth hormone, GH) 是脊椎动物脑垂体细胞合成和分泌的一种单链多肽激素, 在动物的生长、发育和生殖过程中发挥重要作用。GH 通过与靶细胞膜上的生长激素受体 (Growth hormone receptor, GHR) 结合, 从而开启 JAK2/STAT 信号转导途径来发挥生理功能。目前, GHR 的 cDNA 序列已经从人及其它许多哺乳动物类 (Godowski et al., 1989)、鸟类 (Burnside et al., 1991) 和鱼类 (Lee et al., 2001) 中克隆得到。通过生物信息学的方法, 我们发现鱼类基因组中可能存在另外一个基因编码的生长激素受体 (GHR2)。我们也分析了人、大鼠、小鼠和鸡的基因组, 并没有发现存在两种基因编码 GHR 的情况 (Jiao et al., 2006)。鱼类基因组和哺乳动物基因组最大的区别在于鱼类的祖先可能发生了一次特异性的基因组复制的行为 (Taylor et al., 2003; Hoegg et al., 2004; Meyer and Van de Peer, 2005)。因此, 鱼类两种 GHR 很可能是基因复制的产物。

生长促乳素 (Somatolactin, SL) 是生长激素/催乳素 (Prolactin, PRL) 家族一种新的脑垂体蛋白质激素, 目前仅在鱼类发现该激素, 但一直没有找到相应的受体 (Somatolactin receptor, SLR)。最近有报道从大麻哈鱼 (*Oncorhynchus masou*) (Fukada et al., 2005) 和青鳉 (*Oryzias latipes*) (Fukamachi et al., 2005) 中克隆得到 SLR 全长 cDNA 序列。Fukamachi 等同时还提出: 传统的鱼类 GHR (GHR1) 实际上是鱼类生长促乳素受体 SLR, 而他们克隆得到的青鳉 GHR 以及大麻哈鱼 GHR, 即 GHR2, 才是鱼类真正的生长激素受体。

南方鲇 (*Silurus meridionalis*) 生长快, 肉味鲜嫩, 经济价值较高。对南方鲇 GHR 的研究将有助于我们对其生长规律的认识以及人工养殖技术的发展。本文采用 RT-PCR 和 RACE 结合的方法从南方鲇中克隆得到了 GHR1 和 GHR2 全长 cDNA, 并分析了硬骨鱼 GHR1 和 GHR2 的结构差异, 讨论了它们与 SLR 的关系, 同时采用半定量 RT-

PCR 的方法研究了这两种 GHR 在南方鲇不同组织中表达的差异以及激素处理对两种受体表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

克隆及组织分布所用南方鲇采集自重庆嘉陵江北碛段, 健康且性成熟。快速提取其脑、垂体、肝脏、脾脏、心脏、性腺、肌肉、鳃、肠、肾脏 10 个组织, 液氮速冻, 置 -80°C 保存。激素处理所用南方鲇为人工饲养的南方鲇幼鱼, 体重在 90 ± 16.2 g, 于室内 $40\text{ cm} \times 40\text{ cm} \times 60\text{ cm}$ 玻璃水族箱内饲养。本实验所用 PCR 引物由 Invitrogen 公司和上海生工生物工程公司合成。 EX Taq 酶和 DNaseI (RNase free) 和 pMD-18T 载体购自大连宝生物工程公司, RNA 提取试剂盒为 ROCHE 公司产品, SmartTM Race cDNA Amplification kit 试剂盒购自 Clontech 公司, 胶回收试剂盒为 Qiagen 公司产品。 17β -雌二醇、 17α -甲基睾酮购自 Argent 公司, 可的松为天津金耀氨基酸有限公司产品。其余均为国产分析纯试剂。大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 从东方鲀基因组中分离出 GHR1 和 GHR2 基因 用多个已知的鱼类 GHR 氨基酸序列 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 东方鲀 (*Fugu rubripes*) 基因组数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)。在东方鲀基因组中得到两个相似性最高的重叠群 (Contig), GenBank 序列号为: CAAB01001386 和 CAAB01001701。根据 contigs 序列, 找到各自在基因组中的位置, 并依据内含子开始和结束的标志 GT……AG 逐个寻找东方鲀 GHR1 和 GHR2 基因的外显子和内含子。

1.2.2 南方鲇 GHR1 和 GHR2 cDNA 的克隆 南方鲇 GHR1 的简并引物根据 GenBank 中鱼类传统的 GHR 和其它四足动物 GHR 保守序列设计, 而 GHR2 的简并引物根据 GenBank 中已有的银大麻

哈鱼 (*Oncorhynchus kisutch*)、马苏大麻哈鱼 (*Oncorhynchus masou*) 和虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) GHR 核苷酸序列与在东方鲀基因组中分

离的 GHR2 核苷酸序列, 在保守区设计简并引物, β -actin 引物序列参照金鱼 β -actin 序列设计。所有引物见表 1。

表 1 克隆南方鲀 GHR1 和 GHR2 cDNA 序列所用引物

Table 1 Primers used for cloning GHR1 and GHR2 cDNA of the southern catfish

引物 Primer	序列 Sequence
G1-F1	CC (AGCT) AA (AG) GG (AGCT) AT (ACT) GA (CT) CC
G1-F2	GA (CT) CC (AGCT) TGGGT (AGCT) AG (AG) TT (CT) AT
G1-F3	CCCAACTTGTATCCTGACGAT
G1-F4	CCCTCTGGTCAGCAGGAGCAACT
G1-R1	TC (AGCT) (GC) (AT) (AGCT) AC (CT) TG (AGCT) GC (AG) TA (AG) AA (AG) TC
G1-R2	CCAGGGTCGAGCACCATCAGCTGGATA
G1-R3	GGTGTGGAGTTGCTCCTGCTGACCAGA
G2-F1	AACCAGACCCTCC (AG) (AC) (AT) (AG) G (AC) GCTGA
G2-F2	AA (AG) A (TCA) AT (CT) GTG (GT) (AT) (AT) CCAGACCC
G2-F3	GACAATGGCAAGGACACACAGG
G2-F4	CATGCTGATCCTGATTGTGCTGTCCG
G2-R1	AGATCAGGGTCACAGCAGCTGGC
G2-R2	TGGAGGGGAGTCAGATACACGGG
G2-R3	AATCCCCAAAGTTGTAGCCCCCTC
β -actinF	CCATCTCTGCTCGAAGTC
β -actinR	CACTGTGCCATCTACGAG
Smart race 5' primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
Smart race 3' primer	ATTCTAGAGGCCGAGGCGCCGACATG-d (T) ₃₀ N ₋₁ N

利用 SmartTM Race cDNA Amplification kit 试剂盒克隆两种 GHR cDNA。提取南方鲀肝脏 RNA, 逆转录合成第一链 cDNA, 用简并引物 G1-F1 和 G1-R1, G2-F1 和 G2-R1 扩增南方鲀 GHR1 和 GHR2 中间部分编码区域。取 2 μ l 第一轮 PCR 产物为模板, 用简并引物 G1-F2 和 G1-R1, G2-F2 和 G2-R1 进行半巢式 PCR 扩增、测序。根据所得序列设计基因特异性引物 G1-F3、G1-F4 和 G1-R2、G1-R3 以及 G2-F3、G2-F4 和 G2-R2、G2-R3, 结合 SmartTM Race 3' Primer 和 5' Primer 克隆得到南方鲀两种 GHR cDNA。实验参照 SmartTM Race cDNA Amplification kit 试剂盒说明书进行。PCR 反应体系为 25 μ l, 反应条件为预变性 94 $^{\circ}$ C 3 min; 变性 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 68 $^{\circ}$ C - 70 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 36 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min, 取 6 μ l PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳, 然后进行切胶回收, 产物亚克隆到 pMD-18T 载体上, 具体操作见说明书。蓝白斑挑选后由上海生工生物工程公司完成 DNA 测序。

1.2.3 序列分析与进化树的构建 根据已克隆获

得的南方鲀 GHR1 (scGHR1, GenBank 序列号为 AY336104) 和 GHR2 (scGHR2, GenBank 序列号为 AY973231) cDNA 序列应用 DNASTAR 软件推导氨基酸序列并进行比较。下载 GenBank 中一些脊椎动物包括推导出来的东方鲀和斑马鱼 (*Danio rerio*) GHR 氨基酸序列以及大麻哈鱼和青 SLR 氨基酸序列: 南方鲀 GHR1 (AY336104); 草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) GHR1 (AY283778); 金鱼 (*Carassius auratus*) GHR1 (AF293417); 尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) GHR1 (AY973232); 莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) GHR1 (AB115179); 比目鱼 (*Scophthalmus maximus*) GHR1 (AF352396); 日本比目鱼 (*Paralichthys olivaceus*) GHR1 (AB058418); 黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*) GHR1 (AF502071); 金头鲷 (*Sparus aurata*) GHR1 (AF438176); 日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) GHR 亚型 1 (isoform1) (AB180476); 日本鳗鲡 GHR 亚型 2 (isoform2) (AB180477); 黑鲷 GHR2 (AY662334); 尼罗罗非鱼 GHR2

(AY973233); 银大麻哈鱼 GHR 亚型 1 (isoform1) (AF403539); 银大麻哈鱼 GHR 亚型 2 (isoform2) (AF403540); 虹鳟 GHR2 (AY751531); 马苏大麻哈鱼 GHR2 (AB071216); 南方鲇 GHR2 (AY973231); 爪蛙 (*Xenopus laevis*) GHR (AF193799); 小鼠 (*Mus musculus*) GHR (NM 010284); 羊 (*Ovis aries*) GHR (M82912); 牛 (*Bos taurus*) GHR (NM 176608); 人 (*Homo sapiens*) GHR (NM 000163); 兔 (*Oryctolagus cuniculus*) GHR (AF015252); 猪 (*Sus scrofa*) GHR (X54429); 狗 (*Canis familiaris*) GHR (AF133835); 鸡 (*Gallus gallus*) GHR (NM 001001293); 家鸽 (*Columba livia*) GHR (D84308); 马苏大麻哈鱼 SLR (AB121047); 青 SLR (DQ002886); 青 GHR (DQ010539)。用金鱼催乳素受体 (PRLR) (AF144012) 作外类群, 采用 Clustal X 软件进行序列比较分析后构建 NJ 系统进化树。

1.2.4 南方鲇两种 GHR mRNA 在各组织中的表达 提取南方鲇脑、垂体、肝脏、脾脏、心脏、性腺、肌肉、鳃、肠、肾脏的 RNA, 经 DNaseI 处理后逆转录合成第一链 cDNA, 利用基因特异性引物 G1-F3 和 G1-R2, G2-F3 和 G2-R2, β -actinF 和 β -actinR 扩增 GHR1 (446 bp)、GHR2 (483 bp) 和 β -actin (900 bp) 片段。反应体系 25 μ l, 反应条件为预变性 94 $^{\circ}$ C 3 min, 变性 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 57 $^{\circ}$ C - 59 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 分别在 20、22、24、26、28、30、32、34 个循环后取 6 μ l PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳, 以确定 PCR 反应的线性增长范围。经 3 轮 PCR 反应后, 确定 GHR1、GHR2 和 β -actin 合适的循环圈数为 30 圈, 30 圈和 25 圈, 然后各自在上述线性增长圈数内扩增

GHR1、GHR2 和 β -actin。取 6 μ l PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳, 用 BIO-RAD 公司成像系统成像, 用配套软件 Quantity One 对 GHR1、GHR2 和 β -actin 产物进行光密度分析, 并计算 GHR1 和 β -actin, GHR2 和 β -actin 的光密度比值, 评估南方鲇 GHR1 和 GHR2 的相对表达水平。

1.2.5 激素对南方鲇两种 GHR mRNA 水平的影响 选取人工饲养的南方鲇幼鱼, 体重 90 \pm 16.2 g, 于室内 40 cm \times 40 cm \times 60 cm 玻璃水族箱内饲养。以新鲜猪肝切碎为饵料, 每天定时投喂 1 次至饱食。实验分 4 个组 (E2, MT, cortisol 和对照组), 每个实验组用 5 尾实验鱼。17 β -雌二醇、17 α -甲基睾酮和可的松分别用植物油溶解, 进行腹腔注射, 对照组注射植物油, 注射剂量均为 1.0 μ g/g B.W.。每两天注射一次, 每次注射均在当天 17:00 进行, 一共注射 4 d, 并于最后一次注射后 24 h 取其肝脏。用上述半定量 RT-PCR 方法考察 GHR1 和 GHR2 mRNA 水平变化差异。

1.2.6 数据分析 用 3 个平行重复实验的平均值 \pm 标准差表示南方鲇两种 GHR mRNA 表达量, 数据分析用 SPSS 软件包 LSD 法进行多重比较, 当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结果

2.1 东方鲇 GHR1 和 GHR2 基因结构

从东方鲇两个相似性很高的 contigs 中分别分离出两个不同基因编码的 GHR, 称为 fGHR1 和 fGHR2。得到的 fGHR1 含有 9 个外显子和 8 个内含子, 包含有 2 034 bp 核苷酸并编码一个 678 个氨基酸残基的蛋白质。同时分离出的 fGHR2 一共有 8 个外显子和 7 个内含子, 包含有 1 725 bp 核苷酸并编码一个 575 个氨基酸残基的蛋白质 (图 1)。

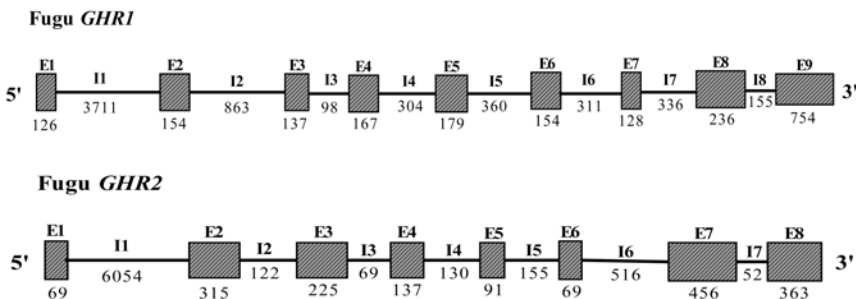


图 1 东方鲇 GHR1 和 GHR2 基因结构模式图

长方形表示外显子, 横线表示内含子, 数字表示外显子和内含子长度。

Fig.1 The schematic representations of fugu GHR1 and GHR2

Rectangles represent exons and lines represent introns. Numbers represent the lengths of exons and introns.

2.2 南方鲇 GHR1 和 GHR2 全长 cDNA 序列

将中间片段、3'RACE 片段和 5'RACE 片段进行拼接, 获得南方鲇 GHR1 (scGHR1, GenBank 序列号为 AY336104) 和 GHR2 (scGHR2, GenBank 序列号为 AY973231) 全长 cDNA 序列。scGHR1 cDNA 全长为 1 958 bp, 编码 602 个氨基酸, 包括 63 bp 的 5'端非编码区 (UTR) 和 89 bp

的 3'端 UTR。scGHR2 cDNA 全长为 2 300 bp, 编码 553 个氨基酸, 包括 421 bp 的 5'端 UTR 和 220 bp 的 3'端 UTR。

2.3 序列分析和进化树的构建

南方鲇 GHR1 和 GHR2 氨基酸序列比较结果见图 2, 两者在结构上既有共同点又有差异。另外, 从构建的系统进化树 (图 3) 可以看出, 鱼类

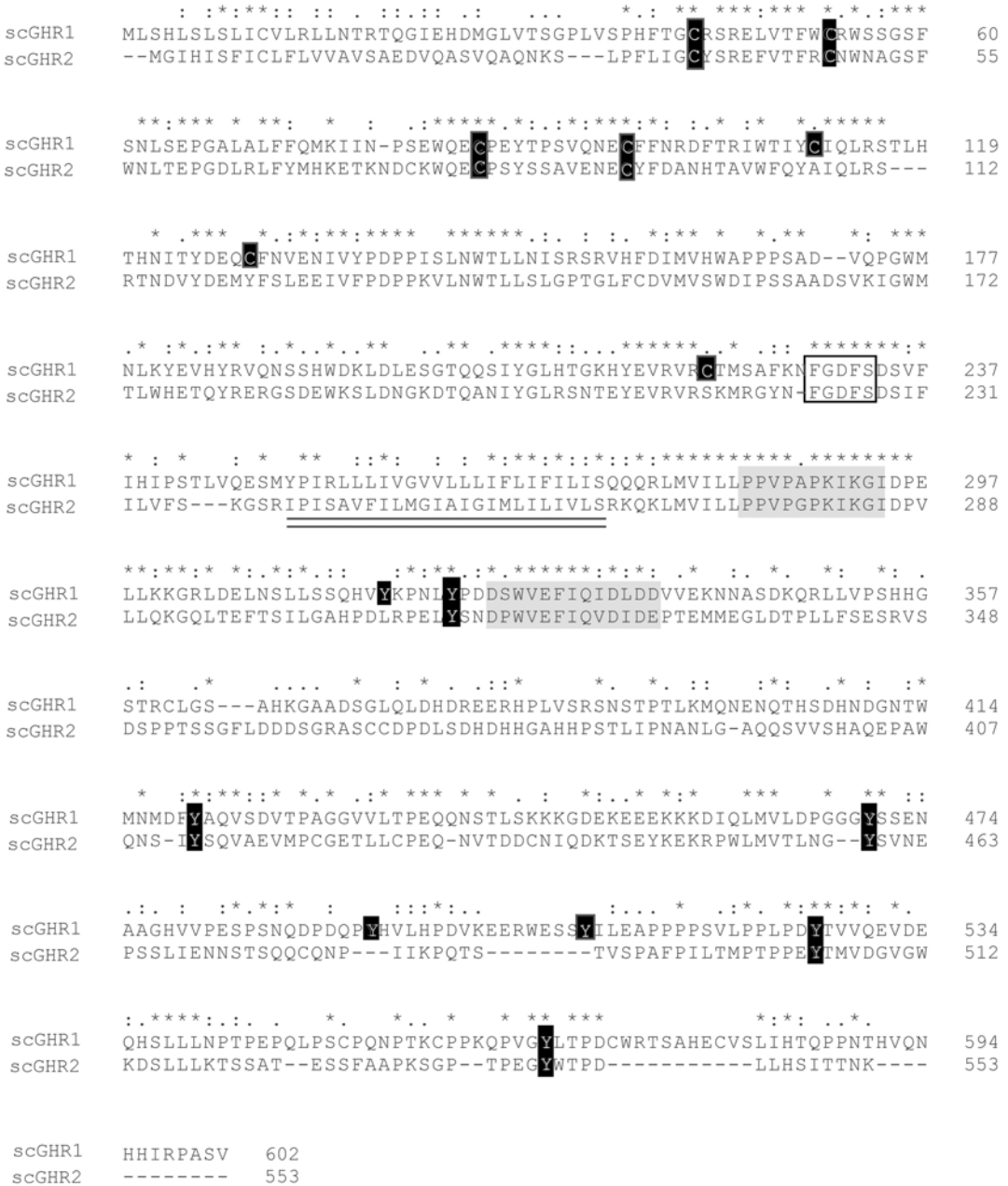


图 2 南方鲇 GHR1 和 GHR2 氨基酸序列比对分析

黑框表示胞外半胱氨酸残基和胞内酪氨酸残基, 矩形框表示 FGDFS, 双线表示跨膜区, 灰色框表示 Box1 和 Box2。

Fig.2 Alignment of scGHR1 and scGHR2 amino acid sequences

The conserved cysteine residues in the extracellular domain and conserved tyrosine residues in the intracellular domain are shaded in dark. The FGDFS motif is boxed by an open rectangle. The transmembrane domain is underlined with two solid lines. The Box1 and Box2 regions are shaded in gray.

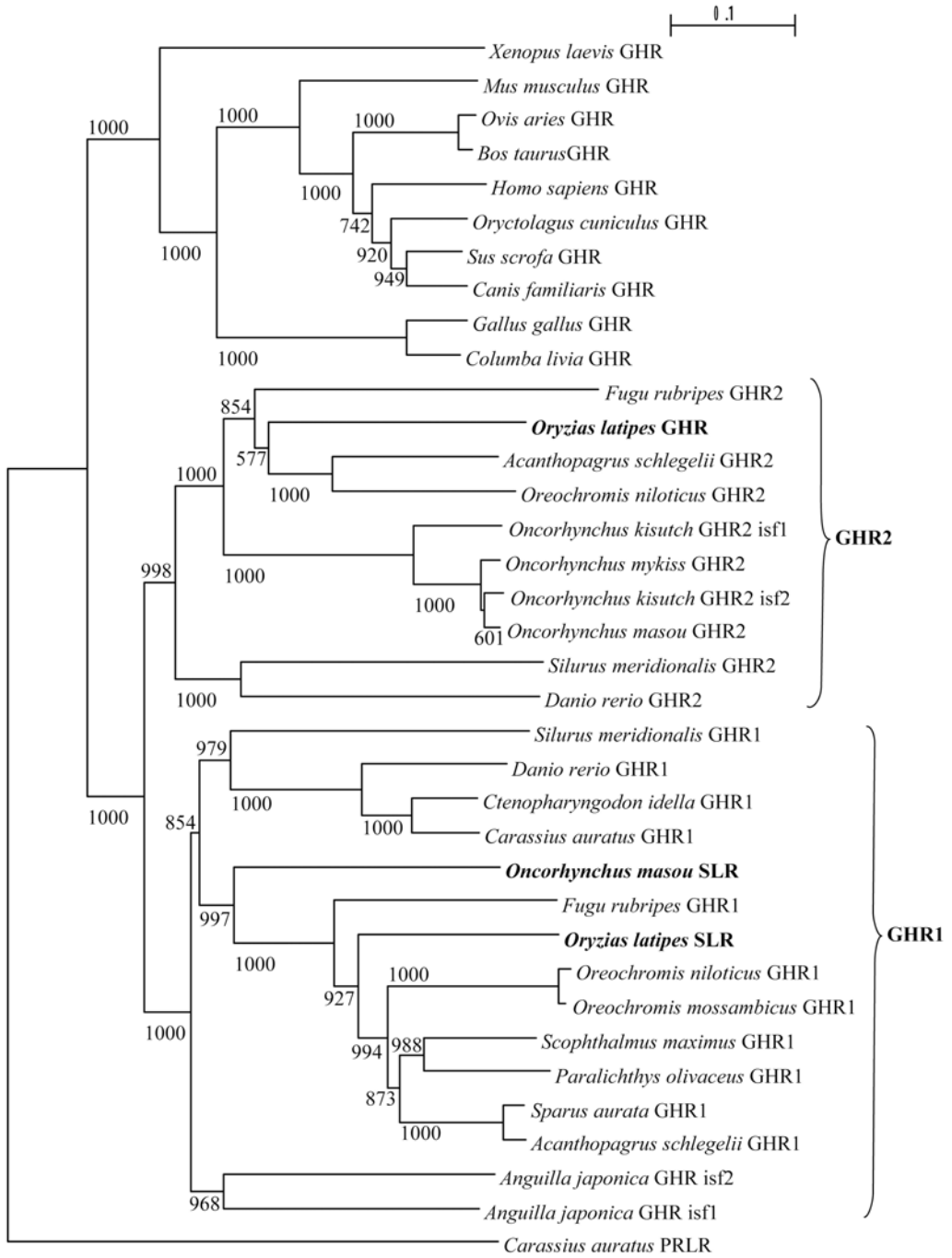


图 3 GHR1, GHR2 和 SLR 的进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of GHR1, GHR2 and SLR from various vertebrates

GHR1 和 GHR2 分别聚类在两个簇，青 鳉 GHR 落在 GHR2 簇，而大麻哈鱼和青 鳉 SLR 与鱼类的 GHR1 同在一个簇中，说明 SLR 与 GHR1 同源性相当高。从进化树还可以看出，GHR2 是鱼类特有的受体，在其他脊椎动物中都没有发现这个受体。

2.4 南方鲇各组织 GHR1 和 GHR2 mRNA 的表达
用基因特异性引物在南方鲇各组织中均扩增出 GHR1 和 GHR2 条带，表明 GHR1 和 GHR2 广泛

表达于南方鲇各组织中。从表 2 和图 4 可以看出 scGHR1 在肝脏中表达量最高，其次为脾脏、鳃和性腺，在肾脏和心脏中表达量最少。而 scGHR2 在大部分组织中表达量都较高，如肝脏、心脏、性腺、脾脏等，在肾脏和垂体中表达量最少。

2.5 激素对南方鲇 GHR1 和 GHR2 mRNA 水平的影响

如表 3 和图 5 所示，注射 17 β -雌二醇后，南方

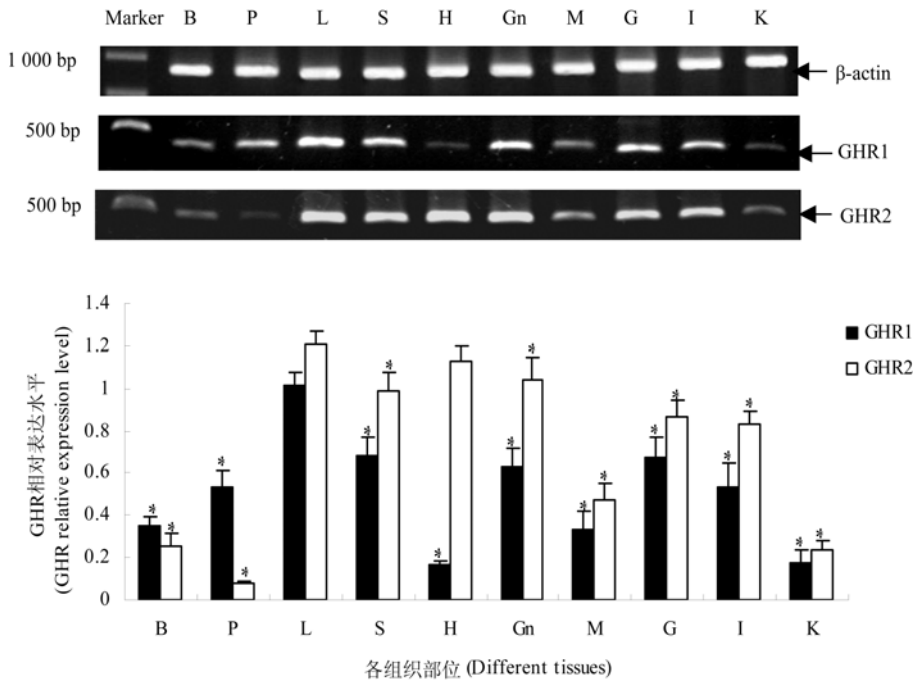


图 4 南方鲇各组织 GHR1 和 GHR2 mRNA 表达的半定量 RT-PCR 分析

Marker: 100 bp DNA Ladder. B: 脑. P: 垂体. L: 肝脏. S: 脾. H: 心脏. Gn: 性腺. M: 肌肉. G: 鳃. I: 肠. K: 肾.

*与肝脏相比, $P < 0.05$ 为差异显著。

Fig. 4 Semi-quantitative RT-PCR analysis of the tissue distribution of GHR1 and GHR2 mRNA in the the southern catfish

Marker: 100 bp DNA Ladder. B: Brain. P: Pituitary. L: Liver. S: Spleen. H: Heart. Gn: Gonad. M: Muscle. G: Gill. I: Intestine. K: Kidney.

* Compared with the relative value of liver, $P < 0.05$.

表 2 南方鲇各组织 GHR1 和 GHR2 mRNA 表达量差异

Table 2 Tissue-specific differences of GHR1 and GHR2 mRNA in the southern catfish

组织 Tissue	GHR1	GHR2
脑 Brain	0.348 ± 0.049*	0.249 ± 0.062*
垂体 Pituitary	0.533 ± 0.077*	0.077 ± 0.009*
肝脏 Liver	1.011 ± 0.068	1.211 ± 0.054
脾脏 Spleen	0.686 ± 0.080*	0.987 ± 0.086*
心脏 Heart	0.167 ± 0.014*	1.131 ± 0.069
性腺 Gonad	0.626 ± 0.094*	1.040 ± 0.101*
肌肉 Muscle	0.329 ± 0.088*	0.474 ± 0.080*
鳃 Gill	0.673 ± 0.093*	0.867 ± 0.079*
肠 Intestine	0.537 ± 0.106*	0.832 ± 0.064*
肾脏 Kidney	0.178 ± 0.054*	0.232 ± 0.047*

数据表示为平均值 ± 标准差, 每组样本数各为 5 尾鱼。*与肝脏相比, $P < 0.05$ 为差异显著。

Data was presented as Means ± SE with five fish. * Compared with the relative value of liver, $P < 0.05$.

鲇肝脏 GHR1 和 GHR2 mRNA 水平显著下降, 而注射 17 α -甲基睾酮后, 两者表达水平都显著上升。同时, 经可的松注射后, scGHR1 表达水平显著上升, 而 scGHR2 水平没有显著改变。

表 3 激素对南方鲇肝脏 GHR1 和 GHR2 mRNA 表达水平的影响

Table 3 Effects of hormone treatment on GHR1 and GHR2 mRNA levels in liver of Southern catfish

	GHR1	GHR2
对照组 Control	1.000 ± 0.015	1.000 ± 0.022
17 β -雌二醇 17 β -estradiol (E2)	0.805 ± 0.037*	0.496 ± 0.041*
17 α -甲基睾酮	1.416 ± 0.027*	1.805 ± 0.012*
17 α -methyltestosterone (MT)		
可的松 Cortisol	1.193 ± 0.084*	1.007 ± 0.010

数据表示为平均值 ± 标准差, 每组样本数各为 5 尾鱼。* $P < 0.05$ 表示激素处理组与对照组比较差异显著。

Data was presented as Means ± SE with five fish. * $P < 0.05$ indicates differences between control and hormonal treatment groups.

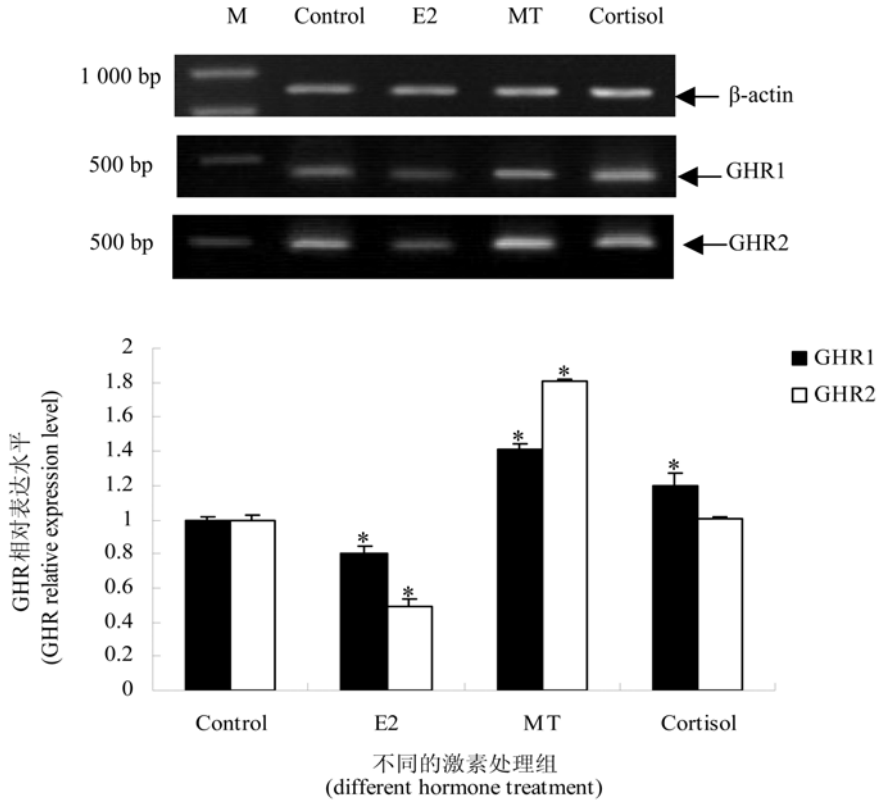


图5 南方鲇肝脏 GHR1 和 GHR2 mRNA 水平在激素处理后的变化 (RT-PCR)

M: 100 bp DNA Ladder。Control: 对照组。E2: 17 β -雌二醇。MT: 17 α -甲基睾酮。Cortisol: 可的松。

* $P < 0.05$ 表示激素处理组与对照组比较差异显著。

Fig.5 RT-PCR analysis of GHR1 and GHR2 mRNA levels in liver during hormone treatment in the southern catfish

M: 100 bp DNA Ladder. E2: 17 β -estradiol. MT: 17 α -methyltestosterone.

* $P < 0.05$ indicates differences between control and hormonal treatment groups.

3 讨论

3.1 GHR1 和 GHR2 的结构特征

本实验采用 RT-PCR 和 RACE 相结合的方法成功地克隆得到南方鲇 GHR1 和 GHR2 全长 cDNA 序列, 同时我们还从黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*) 和尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 中也克隆得到 GHR1 和 GHR2 的 cDNA (Jiao et al., 2006), 表明硬骨鱼类同时存在两种不同基因编码 GHR 是一个普遍现象。通过分析鱼类的两种 GHR, 表明鱼类两种 GHR 在结构上既有共同点又有差异。以南方鲇 GHR 为例, 南方鲇 GHR1 和 GHR2 都有传统 GHR 的一些特征区域 (图 2), 比如两者都有保守的胞外 FGDFS 基序, 胞内的 Box1 和 Box2 序列框。但是 scGHR1 和 scGHR2 在结构上也存在一些显著的差异, 首先两者的胞外半胱氨酸残基数目不同, 在 scGHR1 中, 胞外有 7 个半胱氨酸残基, 而 scGHR2 只有 4 个, 但是在其它所有

已克隆出来的鱼类 GHR2 中都是 5 个胞外半胱氨酸残基。通常两个半胱氨酸残基可以形成一个二硫键, 二硫键对蛋白质空间构象的形成有关键性的影响, 并且激素配体和受体的结合主要是靠空间结构的识别而相互作用的。GHR1 可以形成 3 个二硫键, 而 GHR2 可能只形成 2 个二硫键, 因此 GHR1 与 GHR2 的空间构象可能存在很大差异, 而这种差异很可能会影响到各自与配体的结合程度。据此可以推测, GHR1 和 GHR2 结合配体的类别和方式都可能有一定的差别。其次, 两者胞内的酪氨酸残基数目不同。scGHR1 胞内有 8 个酪氨酸残基, 而 scGHR2 胞内只有 5 个酪氨酸残基, 并且不同鱼种 GHR2 胞内酪氨酸残基数目不同, 在 5-7 之间。由于胞内酪氨酸为重要的磷酸化位点, 是细胞信号激活潜在的功能基团 (Wang et al., 1996), 而 GHR1 和 GHR2 胞内酪氨酸残基数目的不同也表明两者在受体后信号转导过程中可能存在差异。由于 GH 可以调节多种基因的转录, 包括 Spi 2.1、c-

fos、 β -casein、胰岛素和细胞色素 P450 11C13 等，因此可以利用这些被调控基因的启动子构建用于共转染的融合基因，比如 Spi 2.1/CAT、c-fos/Luciferase 等用来作 GHR 功能分析的系统。我们采用上述方法在黑鲷中进行了两种受体的功能研究，结果表明黑鲷 GHR1 (sbGHR1) 和黑鲷 GHR2 (sbGHR2) 受配体刺激后都能激活 Spi 2.1 和 β -casein 启动子活性，并且 sbGHR1 比 sbGHR2 的效应要大得多。但是，另一方面只有 sbGHR1 能激活 c-fos 启动子活性，而 sbGHR2 不能激活其活性，说明 sbGHR1 和 sbGHR2 的信号转导途径有很大差异 (Jiao et al., 2006)。至于在南方鲇中是否也存在如上述黑鲷两种受体信号转导途径上的差异，还有待进一步的实验证实。

3.2 GHR 与 SLR 的关系

目前日本学者克隆并分析了青 GHR 和 SLR 基因结构，并且认为传统的鱼类 GHR (GHR1) 实际上是鱼类 SLR，而青 GHR 以及大麻哈鱼 GHR，即 GHR2，才是鱼类真正的生长激素受体 (Fukamachi et al., 2005)。我们根据对系统进化树 (图 3)、对多个脊椎动物基因组以及 GHRs 和 SLRs 的结构分析认为，Fukamachi 等人的观点值得商榷。首先，从系统进化树可以看出大麻哈鱼和青 SLR 与鱼类的 GHR1 同在一个簇中，说明 SLR 与 GHR1 同源性相当高。其次，Fukamachi 等从青 基因组中分析了其 SLR 和 GHR 的基因结构，发现青 SLR 由 9 个外显子组成，其 GHR 由 8 个外显子组成。我们在东方鲀基因组中分离出来的 GHR1 和 GHR2 也是分别由 9 个和 8 个外显子组成 (图 1)。青 SLR 除了与鱼类 GHR1 在基因结构上存在相似性外，在蛋白质结构上也非常相似，二者都有 7 个胞外半胱氨酸残基，同时人 GHR 也是有 7 个胞外半胱氨酸残基。更为重要的是，从青 基因组中无法找到 GHR1，而从东方鲀的基因组中也无法找到 SLR。因此，被命名为 GHR1 和 SLR 的基因很可能是同物异名。其次，人的 GHR 蛋白编码区也是由 9 个外显子组成。没有理由将基因组成和结构上与人 GHR 相同的鱼类 GHR1 命名为 SLR，而将只有 8 个外显子且基因结构上与人 GHR 相差甚远的鱼类 GHR2 看成是鱼类真正的 GHR。最近，我们发现鱼类还同时存在两种催乳素受体 (PRLR) (未发表资料)，并且从青 和东方鲀基因组中也分离出了这两种 PRLR，它们的蛋白质编码区都是由 8 个外显子组成。

对基因组的分析发现，在人 (5p12 - 5p13)、小鼠 (15A1)、鸡 (Z)、蛙等四足动物中，GHR 与 PRLR 位于同一染色体上；在河鲀鱼 (*Tetraodon hispidus*)，GHR1 与 PRLR2 位于 12 号染色体上，而 GHR2 和 PRLR1 推测位于 4 号染色体上。这反映出鱼类的两个 GHR 和两个 PRLR 很可能是基因复制的产物，源于鱼类特有的基因组复制 (Hoegg et al., 2004)。

以上仅仅是理论分析，我们认为要解决 GHR1 和 SLR 的争议，最终要通过受体结合实验 (Receptor binding assay) 才能得出。如果 GHR1 和 GHR2 都能与配体 GH 结合，且亲和力大于与 SL 结合的亲和力，就可认为鱼类拥有两个 GHR；相反，如果其中一个受体与 SL 结合的亲和力大于与 GH 结合的亲和力，则该受体应命名为 SLR。这将是我们后续研究的重点。如果真的如 Fukamachi 等所言：GHR1 是 SLR，那么根据基因连锁的关系，从鱼类克隆的两个 PRLR 之一是否是鱼类脑垂体中另一个目前尚未被我们所发现的生长因子的受体而非真正的 PRLR？对这些问题的深入研究，必将开创鱼类生理学和比较内分泌学研究的一个崭新领域。

3.3 南方鲇 GHR1 和 GHR2 的组织分布

半定量 RT-PCR 是一种常用的检测组织表达分布的方法，具有简捷快速、高度特异性的优点。本实验以 β -actin 为内参，是因为 β -actin 的 mRNA 水平在多数组织中表达相对稳定，并且不受外界环境变化的影响，因此可作为用于衡量比较细胞内某些其它因子表达变化的参照指标。本研究表明，scGHR1 和 scGHR2 广泛分布于南方鲇各个组织，在肝脏中，两者的表达水平最高，说明肝脏可能是 GH 作用的主要靶器官，这与其它鱼类 GHR 组织表达的研究结果一致 (Lee et al., 2001; Tse et al., 2003; Fukada et al., 2004; Saera-Vila et al., 2005; Jiao et al., 2006)。但是两种 GHR 在某些组织的表达情况有所不同，比如 scGHR1 在心脏中的表达水平显著低于 scGHR2 在心脏中的表达水平。这种组织表达上的差异表明两种受体对体内靶组织可能发挥不同的生理功能。

3.4 激素对南方鲇 GHR1 和 GHR2 mRNA 水平的影响

目前，有关类固醇激素对 GHR 表达调节的研究主要集中在哺乳类，对鱼类的研究很少。本研究表明，经 17β -雌二醇 (E2) 处理后，南方鲇肝脏

GHR1 和 GHR2 mRNA 水平显著下降。但是在哺乳动物中, 性类固醇激素对 GHR 的调节表现出种间差异。有人在切除睾丸的雄兔中发现, 经 E2 处理后, 其肝脏 GHR mRNA 水平下降 (Yu et al., 1996), 但是经 E2 处理的大鼠, 其肝脏 GHR mRNA 水平上升 (Carmignac et al., 1993)。在鱼类, E2 对 GHR 的影响是否存在种间差异还有待进一步证实。最近, Leung 等证明了雌激素通过抑止 JAK2 磷酸化从而抑止 GHR 信号转导途径——JAK/STAT 途径, 因此有可能会下调 GHR 的表达 (Leung et al., 2003)。雄激素对哺乳动物 GHR 的影响也呈现种间差异。注射睾酮会促使兔肝脏 GHR mRNA 水平上升 (Yu et al., 1996), 但是对大鼠肝脏 GHR mRNA 水平没有改变 (Carmignac et al., 1993)。雄激素同样也影响鱼类的生长。有报道, 甲基睾酮会促进罗非鱼生长 (Riley et al., 2002; Sparks et al., 2003), 但是对鲈鱼生长有抑制作用 (Mandiki et al., 2004, 2005)。目前, 有关雄激素对硬骨鱼 GHR 水平的研究几乎未见报道。本研究结果表明, 给南方鲇在体注射 17α -甲基睾酮后, 促进了肝脏 GHR1 和 GHR2 mRNA 水平的显著上升。总体来看, GHR1 和 GHR2 都受性类固醇激素的调节, 并且 GHR2 比 GHR1 对性激素更敏感, 变化幅度也较大。除了性激素外, 可的松也能调节 GHR 的表达, 并且对哺乳动物 GHR 的表达有组织特异性。Li et al. (1999, 2002) 报道经可的松处理的绵羊胎儿肝脏 GHR mRNA 水平上升, 但是骨骼肌 GHR mRNA 水平没有显著改变。南方鲇肝脏 GHR1 mRNA 水平经可的松处理后显著上升, 但是 GHR2 mRNA 水平没有改变, 暗示两种受体在体内可能发挥不同的功能。目前在哺乳动物 GHR 基因的 5' 调控区发现了一些调节序列, 包括雌激素应答元件 (Estrogen response element) 和糖皮质激素应答元件 (Glucocorticoid response element) (Goodyer et al., 2001; O'Mahoney et al., 1994; Menon et al., 1995), 因此类固醇激素对 GHR 转录水平的调节可能是通过与上述应答元件作用从而影响 GHR 的转录水平。

致 谢 本研究得到香港中文大学生化系郑汉其 (Christopher H. K. Cheng) 教授的大力支持, 特此致谢!

参考文献 (References)

Burnside J, Liou SS, Cogburn LA, 1991. Molecular cloning of the

- thicken growth hormone receptor complementary deoxyribonucleic acid: mutation of the gene in sex-lined dwarf chickens. *Endocrinology* 128: 3 183–3 192.
- Carmignac DF, Gabriellsson BG, Robinson IC, 1993. Growth hormone binding protein in the rat: effects of gonadal steroids. *Endocrinology* 133: 2 445–2 452.
- Fukada H, Ozaki Y, Pierce AL, Adachi S, Yamauchi K, Hara A, Swanson P, Dickhoff WW, 2004. Salmon growth hormone receptor: molecular cloning, ligand specificity, and response to fasting. *Gen. Comp. Endocrinol.* 139: 61–71.
- Fukada H, Ozaki Y, Pierce AL, Adachi S, Yamauchi K, Hara A, Swanson P, Dickhoff WW, 2005. Identification of the salmon somatolactin receptor, a new member of the cytokine receptor family. *Endocrinology* 146: 2 354–2 361.
- Fukamachi S, Yada T, Mitani H, 2005. Medaka receptors for somatolactin and growth hormone: phylogenetic paradox among fish growth hormone receptors. *Genetics* 171: 1 875–1 883.
- Godowski PJ, Leung DW, Meacham LR, Galgani JP, Hellmiss R, Keret R, Rotwein PS, Parks JS, Laron Z, Wood WI, 1989. Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron-type dwarfism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 8 083–8 087.
- Goodyer CG, Zogopoulos G, Schwartzbauer G, Zheng H, Hendy GN, Menon RK, 2001. Organization and evolution of the human growth hormone receptor gene 5'-flanking region. *Endocrinology* 142: 1 923–1 934.
- Hoegg S, Brinkmann H, Taylor JS, Meyer A, 2004. Phylogenetic timing of the fish-specific genome duplication correlates with the diversification of teleost fish. *J. Mol. Evolution* 59: 190–203.
- Jiao B, Huang X, Chan CB, Zhang L, Wang D, Cheng CH, 2006. The co-existence of two growth hormone receptors in teleost fish and their differential signal transduction, tissue distribution and hormonal regulation of expression in seabream. *J. Mol. Endocrinol.* 36 (1): 23–40.
- Lee LT, Nong G, Chan YH, Tse DL, Cheng CH, 2001. Molecular cloning of a teleost growth hormone receptor and its functional interaction with human growth hormone. *Gene* 270: 121–129.
- Leung KC, Doyle N, Ballesteros M, Sjogren K, Watts CK, Low TH, Leong GM, Ross RJ, Ho KK, 2003. Estrogen inhibits GH signaling by suppressing GH-induced JAK2 phosphorylation, an effect mediated by SOCS-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100 (3): 1 016–1 021.
- Li J, Forhead J, Dauncey MJ, Gilmour RS, Fowden AL, 2002. Control of growth hormone receptor and insulin-like growth factor-I expression by cortisol in ovine fetal skeletal muscle. *J. Physiol.* 541: 581–589.
- Li J, Gilmour RS, Saunders JC, Dauncey MJ, Fowden AL, 1999. Activation of the adult mode of ovine growth hormone receptor gene expression by cortisol during late fetal development. *FASEB J.* 13: 545–552.
- Mandiki SN, Babiak I, Bopopi JM, Leprieux F, Kestemont P, 2005. Effects of sex steroids and their inhibitors on endocrine parameters and gender growth differences in Eurasian perch *Perca fluviatilis* juveniles. *Steroids* 70: 85–94.
- Mandiki SN, Houbart M, Babiak I, Vandeloise E, Gardeur JN, Kestemont P, 2004. Are sex steroids involved in the sexual growth dimorphism in Eurasian perch juveniles? *Physiol. Behav.* 80: 603–609.
- Menon RK, Stephan DA, Singh M, Morris Jr SM, Zou L, 1995. Cloning of the promoter-regulatory region of the murine growth hormone receptor gene. Identification of a developmentally regulated enhancer element. *J. Biol. Chem.* 270: 8 851–8 859.
- Meyer A, Van de Peer Y, 2005. From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *Bioessays* 27: 937–945.
- O'Mahoney JV, Brandon MR, Adams TE, 1994. Identification of a liver-specific promoter for the ovine growth hormone receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 101: 129–139.
- Riley LG, Richman NH 3rd, Hirano T, Gordon GE, 2002. Activation

- of the growth hormone/insulin-like growth factor axis by treatment with 17 α -methyltestosterone and seawater rearing in the tilapia *Oreochromis mossambicus*. Gen. Comp. Endocrinol. 127: 285–292.
- Saera-Vila A, Caldach-Giner J-A, Perez-Sanchez J, 2005. Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilt-head sea bream *Sparus aurata*. Gen. Comp. Endocrinol. 142: 193–203.
- Sparks RT, Shepherd BS, Ron B, Richman NH 3rd, Riley LG, Iwama GK, Hirano T, Gordon GE, 2003. Effects of environmental salinity and 17 α -methyltestosterone on growth and oxygen consumption in the tilapia *Oreochromis mossambicus*. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 136: 657–665.
- Taylor JS, Braasch I, Frickey T, Meyer A, Van de Peer Y, 2003. Genome duplication, a trait shared by 22 000 species of ray-finned fish. Genome Res. 13: 382–390.
- Tse DLY, Tse MCL, Chen CB, Deng L, Zhang WM, Lin HR, Cheng CHK, 2003. Seabream growth hormone receptor: molecular cloning and functional studies of the full-length cDNA, and tissue expression of two alternatively spliced forms. Biochim. Biophys. Acta 1 625: 64–76.
- Wang X, Darus CJ, Xu BC, Kopchick JJ, 1996. Identification of growth hormone receptor (GHR) tyrosine residues required for GHR phosphorylation and JAK2 and STAT5 activation. Mol. Endocrinol. 10: 1 249–1 260.
- Yu YM, Domene HM, Stzein J, Counts DR, Cassorla F, 1996. Developmental changes and differential regulation by testosterone and estradiol of growth hormone receptor expression in the rabbit. Eur. J. Endocrinol. 135: 583–590.