

尼罗罗非鱼生长激素及其受体的 cDNA 克隆与 mRNA 表达的雌雄差异*

马细兰¹ 张勇¹ 黄卫人¹ 刘晓春¹ 林浩然^{1,3**} 叶卫²

1. 中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 水生经济动物研究所暨广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广州 510275

2. 番禺国家级罗非鱼良种场, 广州 511453

3. 海南大学海洋学院, 海口 570228

摘要 尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 雌雄鱼生长差异明显, 为了探讨其原因, 本文采用 RT-PCR 方法克隆了尼罗罗非鱼生长激素 (Growth hormone, GH) 及其受体 (Growth hormone receptor, GHR) 的 cDNA 序列, 并应用半定量 RT-PCR 方法比较了雌、雄尼罗罗非鱼垂体 GH mRNA、肝脏 GHR mRNA、肌肉 GHR mRNA 的表达差异。序列分析表明: GH 开放阅读框为 615 bp, 共编码 204 个氨基酸; GHR 开放阅读框为 1 908 bp, 共编码 635 个氨基酸。以 RT-PCR 方法研究了 GH、GHR 在各组织的分布情况, 结果表明: GH 仅在垂体中检测到有表达, 而 GHR 在所检测的 18 种组织中均有表达, 其中以肝脏、肌肉、性腺、下丘脑、胸腺表达量较高。以半定量 RT-PCR 方法进一步比较了雌、雄尼罗罗非鱼垂体 GH mRNA、肝脏 GHR mRNA、肌肉 GHR mRNA 的表达量, 结果表明: 雄鱼垂体 GH mRNA 和肝脏 GHR mRNA 的表达量均显著高于雌鱼, 肌肉 GHR mRNA 的表达量则无显著差异, 推测垂体 GH mRNA 和肝脏 GHR mRNA 表达的雌雄差异是尼罗罗非鱼雌雄生长差异的主要原因之一 [动物学报 52 (5): 924-933, 2006]。

关键词 尼罗罗非鱼 生长激素 生长激素受体 RT-PCR 雌雄表达差异

cDNA cloning of growth hormone, growth hormone receptor and the different expression between male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus* *

MA Xi-Lan¹, ZHANG Yong¹, Huang Wei-Ren¹, LIU Xiao-Chun¹, LIN Hao-Ran^{1,3**}, YE Wei²

1. State Key Laboratory of Biocontrol, Institute of Aquatic Economic Animals and Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic Animals, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China

2. Panyu State-level Tilapia Breeding Center, Guangzhou 511453, China

3. College of Ocean, Hainan University, Haikou 570228, China

Abstract In order to study sex differences in growth in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, we cloned the cDNAs encoding growth hormone and growth hormone receptor from pituitary or liver RNA by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and compared their expressions between male and female by Semi-Quantitative RT-PCR. The

2006-03-07 收稿, 2006-05-15 接受

* 广东省科技计划项目 (No.2004A20105001), 珠海市科技计划项目 (No.PC20051054), 广东省海洋与渔业科技专项资金和教育部高等学校博士学科点专项科研基金 (No.20040558012) 资助 [This research was funded by the grants from Guangdong Provincial Scientific and Technical Program (No.2004A20105001), Zhuhai Scientific and Technical Program (No.PC20051054), Guangdong Provincial Oceanic and Fishery Administration Scientific and Technical Fund and Doctoral Program of the Ministry of Education, China (No.20040558012)]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: ls32@zsu.edu.cn

open reading frame of GH of Nile tilapia consists of 615 bp and encodes a putative protein of 204 amino acids, while the open reading frame of GHR consists of 1 908 bp and encodes a putative protein of 635 amino acids. By Semi-Quantitative RT-PCR, we measured GH and GHR expression in different tissues of Nile tilapia: GH expression was only detected in pituitary, while GHR expression occurred in all types of tissues we measured, and especially in liver, muscle, gonad, hypothalamus and thymus. Thus, by Semi-Quantitative RT-PCR, we further measured the mRNA levels of growth hormone in the pituitaries and growth hormone receptor in livers and muscles of male and female Nile tilapia growing at different rates. Significantly greater expression of GH in pituitaries and GHR in livers was measured in the males than in the females. These results show that different levels of GH and GHR transcription can explain the growth rate differences between male and female Nile tilapia [Acta Zoologica Sinica 52 (5): 924–933, 2006].

Key words Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, Growth hormone, Growth hormone receptor, RT-PCR, Different expression between male and female

生长激素 (Growth hormone, GH) 是脊椎动物由垂体分泌的单链多肽, 具有促进生长、加快蛋白质合成、提高食物转化效率、提高广盐性鱼类渗透压调节能力等作用, 是调节动物生长最主要的内在因素之一 (林浩然, 1999)。GH 通过与靶细胞膜表面的生长激素受体 (Growth hormone receptor, GHR) 结合, 启动细胞内的信号传导机制, 促进胰岛素样生长因子 (Insulin-like growth factor, IGF-I) 的表达, 再通过血液循环到达机体的局部组织, 促进组织细胞的生长和分化。GH 靶组织中 GHR 的多少、功能的正常与否将直接影响到 GH 生理效应的发挥, 例如 GH 拮抗 (Growth hormone resistance) 或 GH 反应迟钝 (Growth hormone insensitivity, GHIS) 病人出现生长缓慢, 其原因在于他们的 GHR 基因发生了变异, 导致 GH 与 GHR 的结合力下降, 从而影响 GH 生理效应的正常发挥 (Ross, 1999); 性连锁矮小鸡的生长迟缓症状也是因为其 GHR 基因异常, 导致组织中 GHR 数量显著减少甚至缺乏所致 (Tanaka et al., 1995)。

国内外学者对鱼类生长轴的相关内容做了许多研究工作, 迄今为止, 已经克隆出了草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)、大西洋鲑 (*Salmo salar*)、黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*)、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 等 40 多种鱼类的 GH。在同一目的鱼类中, GH 的氨基酸组成约有 80% 以上的同源性, 不同目的鱼类只有 38%–68% 的同源性。Lee et al. (2001) 首次报道了硬骨鱼类金鱼 (*Carassius auratus*) 的 GHR cDNA 序列, 到目前为止已有数十种鱼的 GHR 得以克隆, 包括黑鲷 (Tse et al., 2003)、真鲷 (*Sparus aurata*) (Calduch-Giner et al., 2003)、鳗鲡 (*Anguilla japonica*) (Ozaki et al., 2006) 等。鱼类 GHR 在许多组织中有表达, 如: 脑、肾、胃、肠、性腺、肌肉、脂肪等, 其中以肝脏的表达量最高 (Tse et

al., 2003; Calduch-Giner et al., 2003; Ozaki et al., 2006)。有关鱼类 GH 对生长调控方面的报道较多, 但对鱼类 GHR 生长调控研究较少。Calduch-Giner et al. (2003) 比较了真鲷肝 GHR mRNA 在春季和夏季的表达情况, 在夏季 (6 月) 的表达比在春季 (3 月) 高, 与在夏季 (6 月) 血液中 GH、IGF-I 水平较高、生长速度较快是相一致的。在不同营养状况下鱼类 GHR 的表达也有差异, 大马哈鱼 (*Oncorhynchus masou*) 禁食 3 周后肝 GHR mRNA 表达下降, 血液中 GH 水平升高而 IGF-I 水平下降 (Haruhisa et al., 2004); 真鲷禁食 2 周后肝和脂肪 GHR mRNA 表达下降, 肌肉 GHR mRNA 表达不变, 表现出 GHR mRNA 表达调节的组织特异性 (Alfonso et al., 2005)。

尼罗罗非鱼生长速度快, 单位面积产量高, 起捕率高, 抗病力强, 现已在全国范围内广泛推广养殖, 但在养殖过程中出现雌雄鱼生长差异明显的问题, 雄鱼生长快、个体大, 雌鱼则生长慢、个体小, 这就常常导致出池规格相差悬殊, 从而降低了鱼产品的产量和质量 (李家乐等, 1997)。在同等饲养条件下, 同批雌鱼和雄鱼生长差异明显, 排除了光照、水温、水质、食物等外在因子的影响, 可以推测这种生长差异很可能是由其内在生长调节因子的不同所致。

为了探讨尼罗罗非鱼雌雄生长差异的原因, 本文通过克隆得到尼罗罗非鱼生长激素及其受体 cDNA 序列, 对 GH 和 GHR 基因的组织表达情况进行了分析, 并应用半定量 RT-PCR 方法比较了同批生长差异明显的雌鱼和雄鱼脑垂体中 GH、肝脏 GHR、肌肉 GHR mRNA 表达的不同, 探讨了雌雄生长差异的原因, 为鱼类生长调节提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼 尼罗罗非鱼采自广东省番禺国家

级罗非鱼良种鱼场, 组织取出后立即置于液氮, 带回实验室保存在 -80°C 超低温冰箱。克隆基因和组织分布的实验用鱼为 1.5 龄成鱼, 体长为 25.5 ± 2.5 cm, 体重为 586.5 ± 143.9 g; 比较生长差异表达的实验用鱼约为 75 日龄 (2005 年 6 月初孵化的鱼苗, 2005 年 8 月中旬采样) 性未成熟鱼, 性腺发育约处于第 III 期, 此阶段雌雄个体差异已十分明显, 生长速度存在明显差异, 雌雄各 6 尾, 雄鱼体长为 14.9 ± 0.5 cm, 体重为 98.9 ± 11.70 g, 雌鱼体长为 13.9 ± 0.7 cm, 体重为 72.1 ± 11.4 g。

1.1.2 试剂 总 RNA 提取试剂 Trizol Reagent、DNase I、Thermoscript™ RT-PCR 试剂盒购自 Invitrogen 公司, Ex Taq™ 由 TaKaRa 公司生产, E.Z.N.A 质粒提取和胶回收试剂盒为 Omega 公司产品, pGEM-T Easy Vector 载体连接试剂盒购自 Promega 公司, 其余均为国产分析纯试剂。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 由本实验室保存。所有引物由上海生工生物工程公司合成, DNA 序列测定由上海博亚生物公司完成。

1.2 方法

1.2.1 cDNA 克隆与序列分析 以尼罗罗非鱼脑垂体和肝脏为材料, 提取总 RNA, 经 DNase I 处理后, 按 Thermoscript™ RT-PCR 试剂盒说明合成第一链。根据莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) GH, GHR 和 β -actin 的 cDNA 序列编码区两端选取保守区域设计特异引物, 以第一链为模板, 用特异引物对 (GH F1 与 GH R1, GHR F1 与 GHR R1, β -actin F1 与 β -actin R1) 扩增 GH、GHR 和 β -actin cDNA 编码区, 扩增产物分别为 615 bp、2 405 bp 和 974 bp (β -actin cDNA 与莫桑比克罗非鱼完全一致, 在文中略)。PCR 反应程序为 94°C 预变性 3 min, 然后 94°C 变性 30 s–2 min, 55°C 退火 30–60 s, 72°C 延伸 1–2 min, 35 个循环后 72°C 延伸 15 min。将所获得的 PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上 100 V 电泳分离 DNA 片断, 切下目的条带。用 E.Z.N.A 胶回收试剂盒 (Omega) 纯化目的产物, 直接克隆到 pGEM-T Easy 载体上, 挑选阳性克隆进行序列测定。采用 DNA Star 软件进行拼接和推导氨基酸序列, 并与 GenBank 中其它物种的 GH、GHR 序列进行相似性比较。

1.2.2 雌鱼和雄鱼 GH 和 GHR mRNA 的半定量 RT-PCR 分析 提取 6 尾雌鱼和 6 尾雄鱼垂体、肝脏、肌肉总 RNA, 经 DNase I 去除基因组 DNA

后, 以 $1 \mu\text{g}$ 总 RNA 为模板, 进行反转录, 建立尼罗罗非鱼垂体中 GH, 肝 GHR 和 β -actin mRNA 半定量 RT-PCR 分析方法, 其中, β -actin 是作为检测 GH、GHR mRNA 表达的内标。首先确定半定量 RT-PCR 分析方法中适宜的 PCR 循环数, GH 所用引物为 GH F1 和 GH R2, 扩增产物为 573 bp, GHR 所用引物为 GHR F2 和 GHR R2, 扩增产物为 766 bp; β -actin 所用引物为 β -actinF2 和 β -actinR2, 扩增产物为 267 bp (引物选用见表 1)。扩增前, 对 GH、GHR、 β -actin 分别做一个循环数梯度实验 (16、20、24、28、32、36、40 个), 不同循环数 PCR 扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳, 应用 Bio-Rad GEL DOC2000 系统分析信号强度, 选取最大扩增量一半时的 PCR 循环数用作随后半定量 RT-PCR 分析, 本实验的 GH 的循环数为 30, GHR 的循环数为 34, β -actin 的循环数为 24。然后, 以不同量的 RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增, 结果表明扩增产物与模板量之间存在直线相关性 (数据略), 证明所建立的半定量 RT-PCR 分析方法是可行的。

根据上面所建立的方法分别对 GH、GHR、 β -actin 进行半定量 RT-PCR 分析, 取 $4 \mu\text{l}$ GH 或 GHR 和 $4 \mu\text{l}$ β -actin 的 PCR 产物在同一块琼脂糖凝胶 (1.5%) 上电泳, 然后用 Bio-Rad GEL DOC2000 系统对电泳图像进行分析, 结果表示为 GH/ β -actin 和 GHR/ β -actin。

表 1 克隆尼罗罗非鱼 GH 和 GHR cDNA 序列及检测 mRNA 表达所用引物

Table 1 Primers used for cloning and expression analysis of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* GH and GHR

引物 Primers	序列 Sequence	序列位置 Site
GH F1	5'-ATGAAGCTCAGTCGTCCTC-3'	nt 1–18
GH R1	5'-CTACAGAGTGCAGTTTGCT-3'	nt 596–615
GH R2	5'-TACCGTCAGGTAGGTCTCCA-3'	nt 554–573
GHR F1	5'-ACGCATCCTGAGATTGAGTG-3'	nt 1–20
GHR R1	5'-GCTCACTGTAATCATGCATGG-3'	nt 2 385–2 405
GHR F2	5'-ATCCGCTGCAGGATGCAGGC-3'	nt 852–871
GHR R2	5'-GAGTTGCTGTCCAGGAGAC-3'	nt 1 598–1 616
β -actinF1	5'-GATATCATTTGCCTGAAACCG-3'	nt 1–21
β -actinR1	5'-ATGGTGGTACCTCCAGACAG-3'	nt 955–974
β -actinF2	5'-ACGGTATTGTGACCAACTGG-3'	nt 278–297
β -actinR2	5'-TGTGGGTACACCATCACC-3'	nt 525–543

1.2.3 数据分析 用平均值 \pm 标准差表示雌鱼和雄鱼 GH mRNA 及 GHR mRNA 相对表达量, 数据

分析采用 SPSS 统计分析软件 Duncan's 法进行多重比较, 当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结果

2.1 尼罗罗非鱼 GH、GHR cDNA 克隆及序列分析

2.1.1 GH cDNA 克隆及序列分析 尼罗罗非鱼 GH 测序结果和推导的氨基酸序列见图 1。尼罗罗非鱼 GH cDNA 开放阅读框 (ORF) 为 615 bp, 编码 204 个氨基酸, 与已知鱼类的 GH 氨基酸序列具有极高的同源性, 具有鱼类 GH 的基本结构特征, 从起始氨基酸 (M) 到第 17 位氨基酸 (S) 为信号肽部分, 成熟肽为 187 个氨基酸。在成熟肽中有 4 个半胱氨酸 (C), 这 4 个半胱氨酸的位置非常保

守, 它们在成熟肽中形成两个二硫键 (C69 与 C177, C194 与 C202)。在第 201 位有一个 N-糖基化位点。

运用 DNA Star 软件, 将克隆到的尼罗罗非鱼 GH cDNA 序列和氨基酸序列与基因库 (GenBank) 中其它物种 GH 的序列进行相似性比较, 结果表明: 与同属莫桑比克罗非鱼相比, cDNA 序列同源率为 98%, 氨基酸序列同源性高达 99%, 与同一鲈形目的蓝太阳鱼、斜带石斑鱼、金头海鲷、黑鲷相比, GH 的氨基酸组成约有 80% 以上的同源性, 与不同目的鱼类只有 38% - 68% 的同源性, 与四足类脊椎动物则只有 37% - 58% 的同源性, 亲缘关系越近同源性越高。

```

1 ATG AAC TCA GTC GTC CTC CTG CTG TCG GTT GTG TGT TTG GGC GTC TCC TCT CAG CAG ATC 60
1  M N S V V L L L S V V C L G V S S Q Q I 20
61 ACA GAC AGC CAG CGT TTG TTC TCC ATT GCA GTC AAC AGA GTC ACG CAC CTG CAC CTG CTC 120
21 T D S Q R L F S I A V N R V T H L H L L 40
121 GCC CAG AGA CTC TTC TCG GAC TTT GAG AGC TCT CTG CAG ACG GAG GAG CAA CGT CAG CTC 180
41 A Q R L F S D F E S S L Q T E E Q R Q L 60
181 AAC AAA ATC TTC CTG CAG GAC TTC TGC AAC TCT GAT TAC ATC ATC AGC CCG ATC GAC AAA 240
61 N K I F L Q D F C N S D Y I I S P I D K 80
241 CAC GAG ACG CAG CGC AGC TCG GTC CTG AAG CTG CTG TCG ATC TCC TAT GGA CTG GTT GAG 300
81 H E T Q R S S V L K L L S I S Y G L V E 100
301 TCC TGG GAG TTT CCC AGC CGC TCT CTG TCT GGA GGT TCC TCT CTG AGG AAC CAG ATT TCA 360
101 S W E F P S R S L S G G S S L R N Q I S 120
361 CCA AGG CTG TCT GAG CTT AAA ACG GGA ATC TTG CTG CTG ATC AGG GCC AAT CAG GAT GAA 420
121 P R L S E L K T G I L L L I R A N Q D E 140
421 GCA GAG AAT TAT CCT GAC ACC GAC ACC CTC CAG CAC GCT CCT TAC GGA AAC TAT TAT CAA 480
141 A E N Y P D T D T L Q H A P Y G N Y Y Q 160
481 AGT CTG GGA GGG AAC GAA TCG CTG AGA CAA ACT TAT GAA TTG CTG GCT TGC TTC AAG AAG 540
161 S L G G N E S L R Q T Y E L L A C F K K 180
541 GAC ATG CAC AAG GTG GAG ACC TAC CTG ACG GTA GCT AAA TGT CGA CTC TCT CCA GAA GCA 600
181 D M H K V E T Y L T V A K C R L S P E A 200
601 AAC TGC ACT CTG TAG 615
201 N C T L * 204

```

图 1 尼罗罗非鱼生长激素 cDNA 序列和推测的氨基酸序列

划底线部分为信号肽; 方框部分为半胱氨酸 (C); 阴影部分为 N-糖基化位点。

Fig. 1 Nucleotide sequence of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* GH cDNA and the deduced amino acid sequence

Signal peptide of Nile tilapia GH was underlined, cysteines were marked with rectangles, and N-site was shaded with light gray.

2.1.2 GHR cDNA 克隆及序列分析 图 2 为尼罗罗非鱼 GHR 测序结果和推导的氨基酸序列。尼罗罗非鱼 GHR cDNA 开放阅读框 (ORF) 为 1 908 bp, 编码 615 个氨基酸, 具有脊椎动物 GHR 的基本结构特征, 从起始氨基酸 (M) 到第 27 位氨基酸 (T) 为信号肽部分, 第 28 位氨基酸 (F) 到第 253 位氨基酸 (T) 为胞外区部分, 第 254 位氨基

酸 (V) 到第 277 位氨基酸 (S) 为跨膜区, 之后为 359 个氨基酸的胞内区。胞外区在靠近跨膜区的位置有一个保守的 FGEEFS motif, 胞外区有 7 个保守的半胱氨酸 (C48、C58、C91、C101、C115、C132、C224) 和 5 个潜在的糖基化位点 (N57、N98、N146、N153、N192), 胞内区有两个保守的 Box, 还有 6 个保守的酪氨酸 (Y325、Y330、

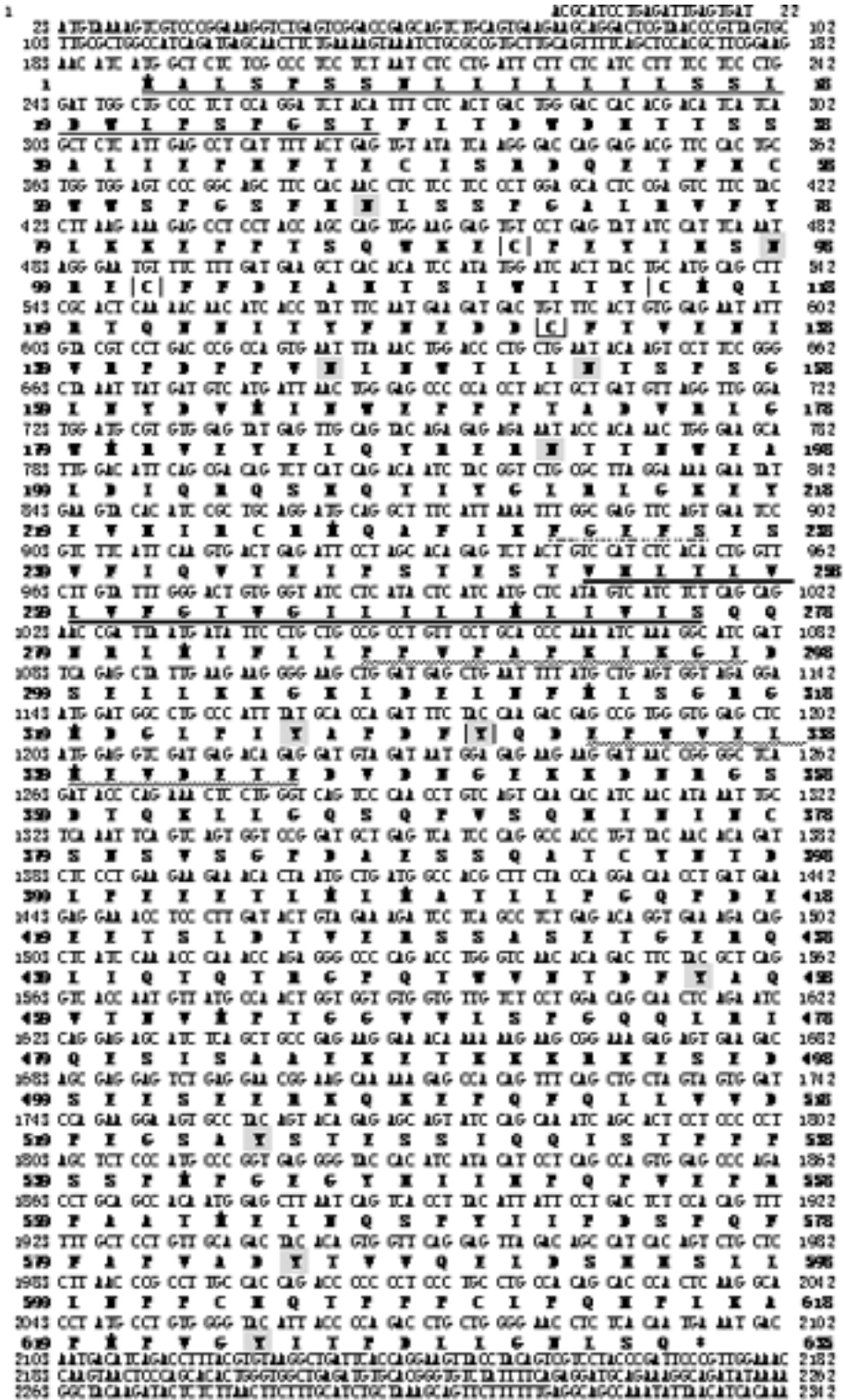


图2 尼罗罗非鱼生长激素受体 cDNA 序列和推测的氨基酸序列
 单底线：信号肽；双底线：跨膜域；波浪线：box1、box2 区；点下划线：FGFEFS motif；方框：半胱氨酸 (C)；阴影：N-糖基化位点 (N)；方框阴影：酪氨酸 (Y)。

Fig.2 Nucleotide sequence of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* GHR cDNA and the deduced amino acid sequence
 Signal peptide (underlined with a single line); transmembrane domain (underlined with double lines); box1 and box2 regions (underlined with undee line); FGFEFS motif (underlined with a dotted line); cysteines residues (marked with rectangles); N-site (shaded with light gray); tyrosine residues (marked with rectangles and light gray).

Y456、Y524、Y585、Y624)。

运用 DNA STAR 软件, 将克隆到的尼罗罗非鱼 GHR 氨基酸序列与基因库 (GenBank) 中其它物种的序列进行相似性比较, 结果为: 与同属莫桑比克罗非鱼的氨基酸序列同源性为 98%, 与同一鲈形目的金头鲷为 72%, 与蝶形目的大菱鲂为 72%, 与鲤形目的金鱼为 46%, 与鲱形目的大西洋鲑只有 38%, 与小鼠和人的同源性分别为 35% 和 34%, 相对 GH 而言, GHR 物种间的同源性较低, 但都具备 GHR 的基本特征, 种间的同源性也

基本反映亲缘关系, 即关系越近同源性越高。

2.2 尼罗罗非鱼各种组织中 GH、GHR 的 mRNA 表达

2.2.1 尼罗罗非鱼各种组织中 GH 的 mRNA 表达

用预实验中所建立的半定量 RT-PCR 分析方法对尼罗罗非鱼的 13 种组织进行检测, 结果如图 3 所示, 13 种组织的 β -actin 基因表达相近, 而 GH 基因只在垂体中扩增出来, 说明 GH 只在垂体中表达。

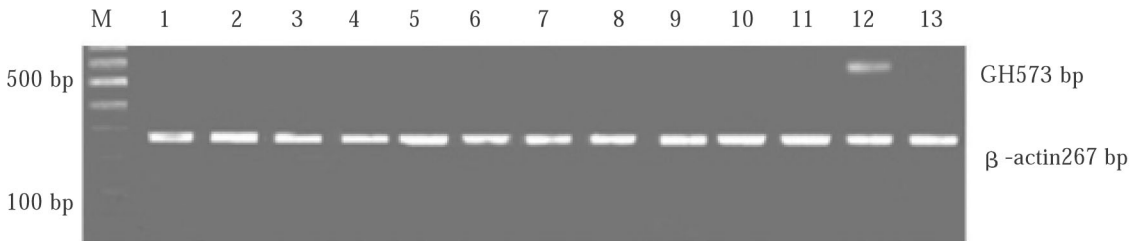


图 3 尼罗罗非鱼 GH 和 β -actin mRNA 表达的半定量 RT-PCR 分析

1: 肌肉。2: 性腺。3: 肾。4: 脾。5: 肝。6: 头肾。7: 胸腺。8: 鳃。9: 后脑。10: 中脑。11: 端脑。12: 垂体。13: 下丘脑。M: 1 000 bp DNA 分子量标准。

Fig.3 Semiquantitative RT-PCR analysis of the tissue distribution of GH and β -actin mRNAs in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*

1: Muscle. 2: Gonad. 3: Kidney. 4: Spleen. 5: Liver. 6: Head kidney. 7: Thymus. 8: Gill. 9: Hindbrain. 10: Midbrain. 11: Telencephalon. 12: Pituitary. 13: Hypothalamus. M: 1 000 bp DNA ladder marker.

2.2.2 尼罗罗非鱼各种组织中 GHR 的 RNA 表达

以预实验中所建立的半定量 RT-PCR 分析方法对尼罗罗非鱼的 18 种组织进行检测, 结果如图 4 所示, GHR 在各组织中均有表达, 有的表达微弱, 有的表达强烈, 以肝脏的表达量最高, 肌肉、胸

腺、下丘脑、性腺的表达量也相对较高。

2.3 尼罗罗非鱼 GH 和 GHR mRNA 表达的雌雄差异

2.3.1 尼罗罗非鱼垂体 GH mRNA 表达的雌雄差异 如图 5、6 所示, 应用半定量 RT-PCR 分析法

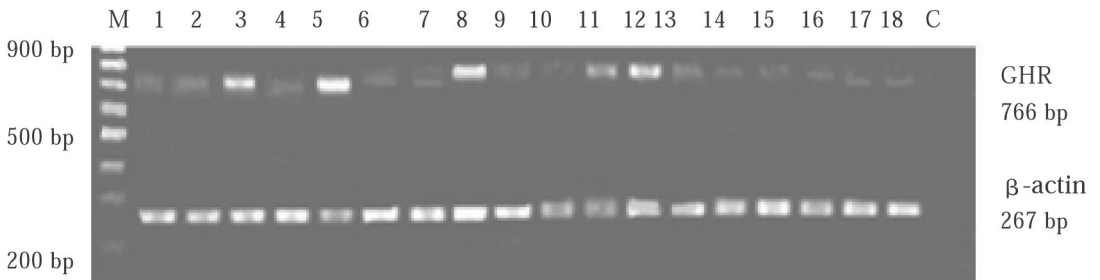


图 4 尼罗罗非鱼 GHR 和 β -actin mRNA 表达的半定量 RT-PCR 分析

1: 鳃。2: 心脏。3: 胸腺。4: 头肾。5: 肝。6: 脾。7: 肾。8: 肌肉。9: 胃。10: 肠。11: 性腺。12: 下丘脑。13: 嗅球。14: 垂体。15: 端脑。16: 中脑。17: 后脑。18: 延脑。C: 阴性对照; M: 1 000 bp DNA 分子量标准。

Fig.4 Semiquantitative RT-PCR analysis of the tissue distribution of GHR and β -actin mRNAs in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*

1: Gill. 2: Heart. 3: Thymus. 4: Head kidney. 5: Liver. 6: Spleen. 7: Kidney. 8: Muscle. 9: Stomach. 10: Intestine. 11: Gonad. 12: Hypothalamus. 13: Olfactory bulb. 14: Pituitary. 15: Telencephalon. 16: Midbrain. 17: Hindbrain. 18: Medulla. C: Negative control. M: 1 000 bp DNA ladder marker.

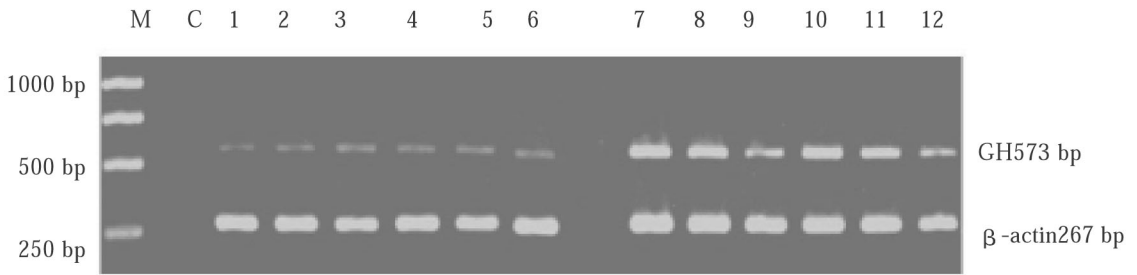


图 5 尼罗罗非鱼垂体组织中 GH mRNA 表达的半定量 RT-PCR 分析

M: 2 000 bp DNA 分子量标准。C: 阴性对照。1-6: 雌鱼。7-12: 雄鱼。

Fig.5 Semi-quantitative RT-PCR analysis of pituitary tissue GH mRNA in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*

M: 2 000 bp DNA ladder marker. C: Negative control. 1-6: Female. 7-12: Male.

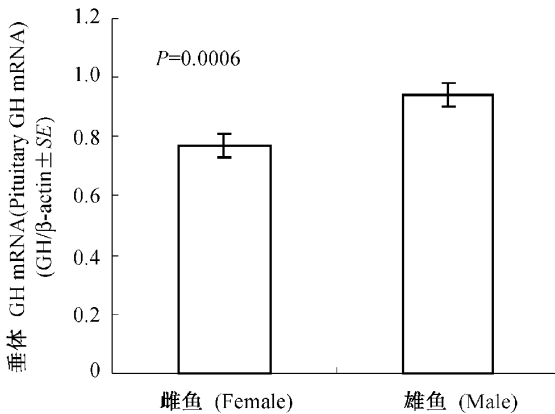


图 6 尼罗罗非鱼垂体 GH mRNA 表达的雌雄差异分析 (n = 6)

Fig.6 Nile tilapia *Oreochromis niloticus* pituitary tissue GH mRNA expression in females and males (n = 6)

检测尼罗罗非鱼垂体中 GH mRNA 的表达量, 以 β -actin 为内参基因。用 Bio-Rad GELDOC2000 系统分析各条带信号强度, 并用 GH 信号强度值与相对应 β -actin 信号强度值的比值表示 GH mRNA 的相对表达量, 即以 GH/ β -actin \pm SE 表示 GH mRNA 的相对表达量, 结果表明雄鱼垂体 GH mRNA 的相对表达量明显高于雌鱼 ($P < 0.01$)。

2.3.2 尼罗罗非鱼肝脏 GHR mRNA 表达的雌雄差异 图 7、图 8 为应用半定量 RT-PCR 分析法测定的尼罗罗非鱼肝脏中 GHR mRNA 的相对表达量, 以 β -actin 为内参基因。用 Bio-Rad GELDOC2000 系统分析表明, 雄鱼肝脏中 GHR mRNA 表达明显高于雌鱼 ($P < 0.01$)。

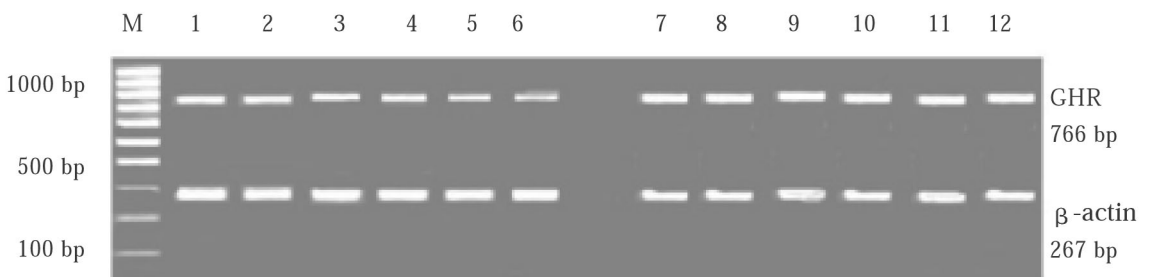


图 7 尼罗罗非鱼肝脏组织中 GHR mRNA 表达的半定量 RT-PCR 分析

M: 1 000 bp DNA 分子量标准。1-6: 雌鱼。7-12: 雄鱼。

Fig.7 Semiquantitative RT-PCR analysis of the liver tissue GHR mRNA in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*

M: 1 000 bp ladder marker. 1-6: Female. 7-12: Male.

2.3.3 尼罗罗非鱼肌肉 GHR mRNA 表达的雌雄差异 由图 9、图 10 可以看出, 雄鱼肌肉中 GHR mRNA 表达量略高于雌鱼, 经方差分析两者差异不显著 ($P > 0.05$)。

3 讨论

如大多数硬骨鱼的 GH 一样, 尼罗罗非鱼 GH

的成熟肽中有 4 个保守的半胱氨酸 (C), 它们可以形成 2 个二硫键 (第 69 位与第 177 位, 第 194 位与 202 位), 二硫键对 GH 的正常折叠、维持空间结构以发挥有效的生理功能有着重要的作用 (林浩然, 1999; Ayson et al., 2000)。鲤鱼 (May et al., 1999) 和鲑鱼 (de Jesus et al., 2002) GH 中有两个 N-糖基化位点, 尼罗罗非鱼 GH 氨基酸序

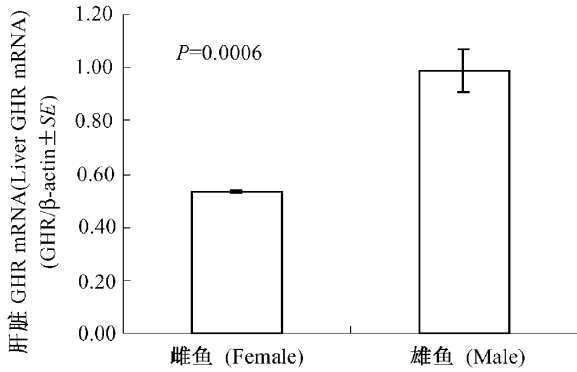


图 8 尼罗罗非鱼肝脏 GHR mRNA 表达的雌雄差异分析 ($n = 6$)

Fig. 8 Nile tilapia *Oreochromis niloticus* liver tissue GHR mRNA expression in females and males ($n = 6$)

列中则只在第201位发现1个Asn-Cys-Thr糖基化位点, 这个糖基化位点是蛋白转入膜的信号, 是硬骨鱼GH的特征之一 (Guan et al., 1985)。

从尼罗罗非鱼肝脏中克隆到的生长激素受体

(GHR) 具有脊椎动物 GHR 的一般特性。胞外区在靠近跨膜区的位置有一个保守的 FGEFS motif, 这是已知鱼类 GHR 的共性之一, 这一结构可能在 GH 与 GHR 结合过程中起着稳定空间构象的作用, 对于 GH 与 GHR 结合及其后的信号转导起非常重要的作用。胞外区有 7 个保守的半胱氨酸, 其中 6 个可形成 3 个二硫键, 起着维持 GHR 胞外区段特定空间结构的作用。胞内区有两个保守的 Box: Box1 富含脯氨酸 (P), 其中最后的两个脯氨酸被认为对整个信号转导过程起关键作用 (Dinerstein et al., 1995); Box2 是与受体的内化作用相关 (Govers et al., 1999), 尼罗罗非鱼 Box2 的保守序列由 WVEFI 变为 WVLM, 但这是一种保守的改变, 氨基酸的极性没有改变; 脊椎动物 Box1 的保守性较 Box2 高, Box2 结构会有较大的改变, 但这种结构的改变对其功能有何影响目前还不清楚, 有待进一步深入研究。

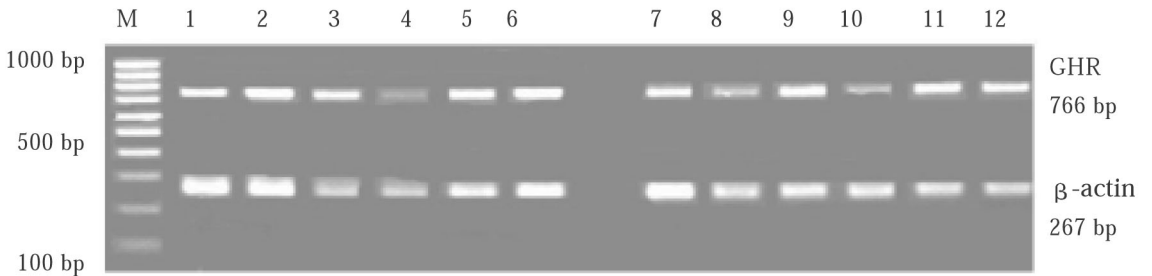


图 9 尼罗罗非鱼肌肉组织中 GHR mRNA 表达的半定量 RT-PCR 分析

M: 1 000 bp DNA 分子量标准。1-6: 雌鱼。7-12: 雄鱼。

Fig. 9 Semiquantitative RT-PCR analysis of muscle tissue GHR mRNA in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*

M: 1 000 bp ladder marker. 1-6: Female. 7-12: Male.

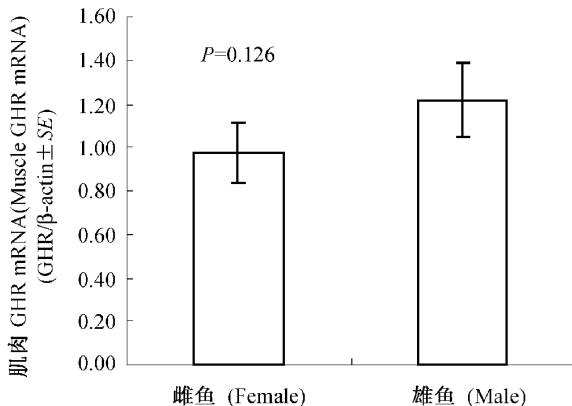


图 10 尼罗罗非鱼 GHR mRNA 表达的雌雄差异分析 ($n = 6$)

Fig. 10 Nile tilapia *Oreochromis niloticus* muscle tissue GHR mRNA expression in females and males ($n = 6$)

用 RT-PCR 方法分别检测了 GH 和 GHR 在尼罗罗非鱼各种组织中 mRNA 的表达情况, 结果表明: GH 只在垂体中检测到表达, 而 GHR 在所测检测的 18 种组织中均有表达, 其中以肝脏的表达最高, 肌肉、性腺、下丘脑、胸腺的表达量也较高, 这与其他鱼类和哺乳类的研究结果相一致 (Tse et al., 2003; Caldach-Giner et al., 2003; Ozaki et al., 2006; Kopchick and Andry, 2000)。尼罗罗非鱼 GHR 在多种组织中都有表达支持了鱼类 GH 具有多种生理功能的观点。

鱼类生长与其它脊椎动物相似, 受到 GH-GHR-IGF 轴调控, 即由下丘脑分泌各种神经内分泌因子在脑垂体水平调节 GH 的分泌, GH 与靶器官 (主要在肝脏) 细胞膜上的受体 (GHR) 结合

传递信号产生胰岛素生长因子 (IGF-I), 从而调节动物的生长。有研究表明鱼类血清 GH 水平与鱼类生长速度密切相关, 例如雄鲑鱼血清 GH 水平显著低于雌鱼, 同龄雄鲑鱼个体明显偏小 (温海深等, 2002), 真鲷在 6 月的血清 GH 水平显著高于 3 月, 在 6 月的生长速度也明显快于 3 月 (Calduch-Giner et al., 2003); 但也有研究表明鱼类血清 GH 水平并不与生长速度相统一, 如禁食后大马哈鱼、真鲷、尼罗罗非鱼血清 GH 水平均升高但生长速度下降甚至出现负增长 (Haruhisa et al., 2004; Alfonso et al., 2005; Toguyeni et al., 1996), 这提示鱼类 GH 的促生长作用可能并不完全依赖于血清 GH 水平的高低, 可能还与 GHR 的数量、GH 的清除率和 IGF-I 的相互作用有关 (王德寿等, 1999)。垂体作为 GH 的后台合成场所, 在正常情况下少量而持续地合成, 在生长快速期之前大量而快速地合成和分泌, 这一现象在硬骨鱼类中具有普遍性。垂体 GH mRNA 在转录水平上反映 GH 的合成速度, 故它也是动物生长速度的一个有效的指标。欧洲鳊雌鱼比雄鱼生长快, 雌鱼垂体 GH mRNA 表达比雄鱼高 67% (Degani et al., 2003)。尼罗罗非鱼雄鱼的生长明显比雌鱼快, 本实验结果也表明雄鱼垂体 GH mRNA 明显高于雌鱼, 即生长快速的鱼其垂体 GH mRNA 表达量高, 这可能是雄性尼罗罗非鱼比雌鱼生长快的内在原因之一。

GH 与 GHR 的结合是 GH 发挥生理作用的启动步骤, GH 生理作用的强弱除了与 GH 的合成分泌相关外还可能与 GHR 数量、亲和性、mRNA 表达水平有直接的关系。例如: 性连锁矮小鸡肝组织中 GHR 数量的显著减少甚至缺乏导致生长迟缓 (Tanaka et al., 1995); GH 拮抗或 GH 反应迟钝病人的血清 GH 水平偏高, 生长缓慢, 主要是因为他们的 GHR 基因发生了变异, 导致 GH 与 GHR 的结合力 (亲合性) 下降, 从而影响了 GH 生理效应的正常发挥 (Ross, 1999); 肉鸡出生 3 周后肝 GHR mRNA 表达量急剧上升, 生长速度也随之急剧提高 (Zhao et al., 2004); 用重组猪 GH 处理猪 28 d 后, 肝脏 GHR mRNA 水平上升, 生长加快 (胥清富*, 2002)。本实验的结果表明: 雄尼罗罗非鱼肝脏 GHR mRNA 表达显著高于雌鱼, 而肌肉

GHR mRNA 表达无显著差异。真鲷禁食 2 周后肝 GHR mRNA 表达明显下降, 而肌肉 GHR mRNA 表达不变 (Alfonso et al., 2005), 这说明肝脏是鱼类 GH 的主要靶器官, 肝脏 GHR 数量和 GHR mRNA 表达水平可在某种程度上体现鱼类的生长状况。大马哈鱼、真鲷、美国鲑鱼禁食后肝 GHR mRNA 表达量均下降, 肝 GHR 的数量随之减少, GH 与 GHR 的结合下降, 肝脏合成 IGF-I 水平也随之下降, 这样就降低了 GH 的促生长作用, 使鱼类的生长变慢 (Haruhisa et al., 2004; Alfonso et al., 2005; Brian et al., 2005)。综上可知: 动物的生长与动物肝脏的 GHR 数量及 GHR mRNA 表达水平密切相关, 肝脏 GHR mRNA 表达高的动物生长较快, 这可能是雄尼罗罗非鱼比雌鱼生长快的另一内在原因。

尽管研究结果已经表明, 尼罗罗非鱼垂体中 GH mRNA、肝脏中 GHR mRNA 的表达存在明显的雌雄差异, 但 GH 生理效应的发挥除受到 GH 靶组织上生长激素受体 (GHR) 的数量影响外, 还受到多种因素如血液中生长激素结合蛋白 (GHP)、IGF-I、胰岛素生长因子结合蛋白 (IGFBPs)、性类固醇激素水平等影响, 为了更深入研究尼罗罗非鱼雌雄生长差异的原因, 有关 GHP、IGF-I、IGFBPs、性类固醇激素等对生长影响的研究有待进一步开展。

参考文献 (References)

- Alfonso SV, Josep ACG, Jaume PS, 2005. Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilthead sea bream *Sparus aurata*. Gen. Comp. Endocrinol. 142: 193-203.
- Ayson FG, de Jesus EG, Amemiya Y, Moriyama S, Hirano T, Kawachi H, 2000. Isolation, cDNA cloning, and growth promoting activity of rabbitfish *Siganus guttatus* growth hormone. Gen. Comp. Endocrinol. 117: 251-259.
- Brian CS, Christopher AM, Geoffrey CW, Brian CP, 2005. Reduction in channel catfish hepatic growth hormone receptor expression in response to food deprivation and exogenous cortisol. Domestic Animal Endocrinology [online].
- Calduch-Giner JA, Mingarro M, Vega-Rubin de Celis S, Boujard D, Perez-Sanchez J, 2003. Molecular cloning and characterization of gilthead sea bream *Sparus aurata* growth hormone receptor (GHR). Assessment of alternative splicing. Comp. Biochem. Physiol. B 136: 1-13.
- de Jesus EGT, Ayson FG, Amemiya Y, Moriyama S, Hirano T, Kawachi H, 2002. Milkfish *Chanos chanos* growth hormone cDNA cloning and mRNA expression in embryos and early larval stages. Aquaculture 208: 177-188.

* 胥清富, 2002. 生长激素作用的靶基因在猪肝脏和肌肉的表达及调控. 南京农业大学博士毕业论文 [Xu QF, 2002. Studies on growth and developmental changes of serum level of some hormones and expression of target genes for growth hormone action in erhualian pigs and large white pigs. Nanjing Agricultural University, Doctor Thesis.]

- Degani G, Tzchori I, Yom-Din S, Goldberg D, Jackson K, 2003. Growth differences and growth hormone expression in male and female European eels *Anguilla anguilla*. Gen. Comp. Endocrinol. 134: 88–93.
- Dinerstein H, Lago F, Goujon L, Ferrag F, Esposito N, Finidori J, Kelly PA, Postel-Vinay MC, 1995. The praline-rich region of the GH receptor is essential for JAK2 phosphorylation, activation of cell proliferation, and gene transcription. Mol. Endocrinol. 9: 1 701–1 707.
- Govers R, ten Broeke T, van Kerkhof P, Schwartz AL, Strous GJ, 1999. Identification of a novel ubiquitin conjugation motif, required for ligand-induced internalization of the growth hormone receptor. European Molecular Biology Organization Journal 18: 28–36.
- Guan JL, Machamer CE, Rose J, 1985. Glycosylation allows cell-surface transport of an anchored secretory protein. Cell 42: 489–496.
- 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.
- Kopchick JJ, Andry JM, 2000. Growth hormone (GH), GH receptor and signal transduction. Mol. Genet. Metab. 71: 293–314.
- 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.
- Li JL, Li CH, Li SF, Ye W, Liang DJ, 1997. Culture performance of hybrids from different strain combinations of *Oreochromis niloticus* X *O. aureus*. Journal of Shanghai Fisheries University 6 (2): 96–101 (In Chinese).
- Lin HR, 1999. Fishphysiology. Guangzhou: Guangdong High Education Press, 210–212 (In Chinese).
- May D, Alrubaian J, Patel S, Dores RM, Rand-Weaver M, 1999. Studies on the GH/SL gene family: cloning of African lungfish *Protopterus annectens* growth hormone and somatolactin and toad *Bufo marinus* growth hormone. Gen. Comp. Endocrinol. 113: 121–135.
- Ozaki Y, Fukada H, Kazeto Y, Adachi S, Hara A, Yamauchi K, 2006. Molecular cloning and characterization of growth hormone receptor and its homologue in the Japanese eel *Anguilla japonica*. Comp. Biochem. Physiol. Part B. 143 (4): 422–431.
- Ross Richard JM, 1999. The GH receptor and GH insensitivity. Growth Hormone and IGF Research 9 (Suppl.) 2: 42–46.
- Tanaka M, Hayashida Y, Wakita M, Hoshino S, Nakashima K, 1995. Expression of aberrantly spliced growth hormone receptor mRNA in the sex-linked dwarf chicken, Gifu 20. Growth Regulation 5: 218–223.
- Toguyeni A, Baroiller JF, Fostier A, Le Bail PY, Kuhn ER, Mol KA, Fauconneau B, 1996. Consequences of food restriction on short-term growth variation and plasma circulating hormones in *Oreochromis niloticus* in relation to sex. Gen. Comp. Endocrinol. 103: 167–175.
- Tse DL, Tse MC, Chan CB, Deng L, Zhang WM, Lin HR, Cheng CH, 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 DS, Lin HR, Zhang WM, 1999. Seasonal changes of the pituitary and serum basal growth hormone level of *Myst macopterus*. Journal Fisheries China 23 (1): 1–5 (In Chinese).
- Wen HS, Lin HR, Xiao D, Wong AOL, Lee EKY, 2002. Seasonal changes and neuroendocrine regulation of growth hormone secretion in feral catfish *Silurus asotus*. Acta Zool. Sinica 48 (2): 213–220 (In Chinese).
- Zhao R, Muehlbauer E, Decuypere E, Grossmann R, 2004. Effect of genotype-nutrition interaction on growth and somatotropic gene expression in the chicken. Gen. Comp. Endocrinol. 136 (1): 2–11.
- 李家乐, 李思晨, 李思发, 叶卫, 梁德进, 1997. 不同组合尼罗罗非鱼 (♀) X 奥利亚尼罗罗非鱼 (♂) 养殖性能差异研究. 上海水产大学学报 6 (2): 96–101.
- 林浩然, 1999. 鱼类生理学. 广州: 广东高等教育出版社, 210–212.
- 王德寿, 林浩然, 张为民, 1999. 大鳍鳞脑垂体和血清生长激素水平的季节变化. 水产学报 23 (1): 1–5.
- 温海深, 林浩然, 肖东, Wong AOL, Lee EKY, 2002. 野生鲢鱼生长激素分泌的季节变化及其神经内分泌调控. 动物学报 48 (2): 213–220.