

# 荧光实时定量 PCR 检测尼罗罗非鱼 GH、GHR、IGF-I 基因方法的建立及初步应用\*

马细兰<sup>1,2</sup>, 易诗白<sup>1</sup>, 张 勇<sup>1</sup>, 李 云<sup>1,3</sup>, 黄卫人<sup>1</sup>, 刘晓春<sup>1</sup>, 林浩然<sup>1</sup>  
(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, 广东 广州 510275; 2. 惠州学院生命科学系, 广东 惠州 516007; 3. 上海海洋大学生命学院, 上海 200090)

**摘 要:** 为了准确分析尼罗罗非鱼生长激素 (growth hormone, GH)、生长激素受体 (growth hormone receptors, GHRs) 和胰岛素样生长因子 I (Insulin-like growth factor-I, IGF-I) 在早期发育阶段的作用, 实验设计了尼罗罗非鱼 GH、GHR、IGF-I 基因的特异性引物, 提取垂体或肝脏总 RNA 并扩增出目的片段, 将 PCR 产物克隆到 pGEM-T Easy 载体, 经质粒 PCR 扩增、酶切和测序鉴定重组质粒, 构建标准曲线等, 成功建立了 GH、GHR、IGF-I 基因荧光实时定量 PCR 检测方法。运用建立的荧光实时定量 PCR 检测了尼罗罗非鱼 GH、GHR 和 IGF-I 基因表达的发育性变化。结果表明在早期发育阶段, 尼罗罗非鱼 GH 与 IGF-I, GHR1 与 GHR2 的 mRNA 表达存在一定的互补关系; GH 的表达与 GHR1 的表达呈显著正相关, 提示 GH 与 IGF-I, GHR1 与 GHR2 在尼罗罗非鱼早期发育的不同阶段起主导作用, 且 GH 可能主要通过 GHR1 的结合起作用。

**关键词:** 尼罗罗非鱼; 荧光实时定量 PCR; GH; GHR; IGF-I; 发育性变化

**中图分类号:** Q7 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2009) 03-0074-06

## Development and Application of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Growth Hormone, Growth Hormone Receptors and Insulin-Like Growth Factor-I Gene Using Real-Time Quantitative PCR

MA Xilan<sup>1,2</sup>, YI Shibai, ZHANG Yong<sup>1</sup>, LI Yun<sup>1,3</sup>, HUANG Weiren<sup>1</sup>, LIU Xiaochun<sup>1</sup>, LIN Haoran<sup>1</sup>

(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. Department of Life Science, Huizhou University, Huizhou 516007, China;  
3. School of Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** To analyze accurately the roles of growth hormone (GH), two growth hormone receptors (GHR1 and GHR2) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) during early development of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, methods of real-time quantitative PCR to examine GH, GHR and IGF-I gene expression were established. Total RNA was extracted from tilapia pituitary or liver tissue and the fragments of target gene were amplified by RT-PCR with special primers. PCR product was cloned into pGEM-T Easy vector. The success of recombinant plasmid was identified by PCR amplified and restriction enzyme analysis. Variation of mRNA levels of GH, GHR1, GHR2 and IGF-I during early development of Nile tilapia was studied applying real-time quantitative PCR. The trends of GH and IGF-I expressions were compensatory, which was the same as that of GHR1 and GHR2. The expression of GH was significantly

\* 收稿日期: 2008-06-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30571425); 广东省科技计划资助项目 (2004A20105001); 珠海市科技计划资助项目 (PC20051054); 惠州学院博士启动基金资助项目 (C207. 0201); 广东省科技兴海资助项目

作者简介: 马细兰 (1976 年生), 女, 博士; 通讯作者: 张勇; E-mail: lsszy@mail.sysu.edu.cn

correlated with that of GHR1 instead of GHR2. The above results suggested that GH or IGF, GHR1 or GHR2 may play different roles during early development of Nile tilapia, furthermore, the actions of GH may mostly mediated through GHR1.

**Key words:** Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*); real-time quantitative PCR; growth hormone; growth hormone receptor; insulin-like growth factor-I; ontogeny

在脊椎动物的卵和胚胎中发现许多母源激素和生长因子的存在<sup>[1]</sup>。在鱼类的受精卵中也可检测到甲状腺激素、性类固醇激素等母源激素的存在<sup>[2]</sup>。在鱼类胚胎和仔鱼中可检测到生长激素 GH 或 GH mRNA 的表达<sup>[3-5]</sup>, 暗示 GH 在鱼类胚胎和仔鱼的发育、生长、存活等方面起重要作用。

GH 主要通过 GHR 的结合起作用, 并且与 IGF-I 相联系, 既然在鱼类胚胎和仔鱼中已有 GH 的存在和 GH mRNA 的表达, 那是否暗示在鱼类胚胎和仔鱼中也有 GHR 和 IGF-I 的存在和 mRNA 表达呢? 在哺乳动物胚胎早期发育过程中可检测到有功能性 GHR 的存在<sup>[6]</sup>; 在老鼠卵母细胞中检测到 IGF-I mRNA 表达及免疫活性 IGF-I、GH 的存在, 但未检测到 GH mRNA 的表达, 这表明老鼠卵母细胞中 IGF-I mRNA 的表达产生了 IGF-I, 但卵母细胞中的 GH 可能是母源性激素<sup>[7]</sup>。鱼类 GHR 的研究起步较晚, 目前只报道了日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) GHR 基因在胚胎及仔鱼中表达的发育性变化<sup>[5]</sup>。有关鱼类 IGF-I 基因在胚胎及仔鱼中表达的研究不多, 主要集中在虹鳟 *Oncorhynchus mykiss* 和真鲷 *Sparus aurata* 上<sup>[8-9]</sup>。

尼罗罗非鱼 (*Nile tilapia*, *Oreochromis niloticus*) 隶属鲈形目 Perciformes, 是联合国粮农组织向全世界推广的优良养殖鱼类, 迄今有关 GH、GHR、IGF-I 在尼罗罗非鱼胚胎及仔鱼中表达发育性变化的研究未见报道, 为此我们探讨了尼罗罗非鱼受精卵及不同日龄仔鱼 GH、GHR1、GHR2 和 IGF-I mRNA 的表达情况, 并分析各基因的发育性变化规律。

目前, 荧光实时定量 PCR (real-time quantitative PCR) 技术已经广泛用于检测基因的表达水平, 可以非常可靠、高灵敏度地对 mRNA 的表达进行绝对定量, 用质粒 DNA 构建标准曲线, 以标准曲线对样品 mRNA 的表达进行可靠性很高的检测。在以往的研究中, 大多数都是用免疫组织化学、原位杂交或半定量 RT-PCR 方法对鱼类的基因进行检测, 这些方法不能对 mRNA 进行准确定量, 只是一种半定量方法。本试验建立了荧光实时定量 PCR 的标准品质粒和标准曲线, 以此来对尼

罗罗非鱼生长轴相关基因的表达进行准确定量, 为进一步阐释其作用的分子机理奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 实验鱼

尼罗罗非鱼取自广东省番禺国家级罗非鱼良种场。2006 年 5 月, 从口孵雌鱼口中获得受精卵, 少量放入经 DEPC 处理的塑料离心管中置液氮保存, 其余带回实验室恒温 (28 °C) 水箱中孵化。孵育出膜后第 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 15, 17, 20, 24, 28, 30 天取样, 整尾鱼苗放入经 DEPC 处理的塑料离心管中置液氮中保存。

### 1.2 试剂与药品

总 RNA 提取试剂 Trizol Reagent 试剂盒购自 Invitrogen 公司。ReverTra Ace-a-™ Kit、Real-time PCR Master Mix 试剂盒购自 TOYOBO 公司。ExTaq PCR kit、Taq™ 由 TaKaRa 公司生产。胶回收试剂盒 E. Z. N. A Gel Extraction Kit 和质粒纯化试剂盒 E. Z. N. A Plasmid Extraction Kit 为 Omega Bio-Tek 公司产品。InsT/Aclone™ PCR Product Cloning Kit 载体连接试剂盒购自 Fermentas 公司。X-gal、IPTG、氨苄青霉素为上海生物工程公司产品; 100 bp DNA Ladder 为天为时代公司产品; PCR 引物由广州赛百胜生物技术公司合成。

### 1.3 仪器设备

PTC-200 thermocycler PCR 扩增仪为 MF Research (U. S. A) 公司产品; 定量实时 RT-PCR 扩增仪为 ABI PRISM 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems); 电泳仪和 Gel Doc 2000 凝胶成像系统为 BioRAD (U. S. A) 公司产品; 核酸蛋白测定仪和 5804R 冷冻离心机为 Eppendorf (Germany) 公司产品; 温控振荡培养箱为江苏省太仓市实验设备厂产品。

## 2 方法

### 2.1 总 RNA 提取

将在液氮中冻存的组织取出, 组织匀浆后, 按照 Trizol Reagent 试剂盒操作说明提取组织的总 RNA, 并根据  $A_{260}$  值计算 RNA 的浓度, 以  $A_{260}/A_{280}$

的比值判断其纯度。提取的 RNA 用 DEPC 处理的灭菌双蒸水融解,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

## 2.2 反转录 (RT) 合成 cDNA

RT 的反应体积为  $20\text{ }\mu\text{L}$ , 样品 RNA  $2\text{ }\mu\text{L}$ 、 $2.5\text{ mmol/L}$  dNTP  $2\text{ }\mu\text{L}$ 、oligo (dT)<sub>18</sub> ( $16\text{ pmol/L}$ )  $2\text{ }\mu\text{L}$ 、 $5\times$  逆转录缓冲液  $4\text{ }\mu\text{L}$ 、AMV 反转录酶  $1\text{ }\mu\text{L}$  ( $5\text{ U}$ )、RNasin  $1\text{ }\mu\text{L}$  ( $40\text{ U}$ ), 补充 DEPC 处理过的水至体积  $20\text{ }\mu\text{L}$ 。上述成分混匀后于 PCR 仪器中,  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$   $45\text{ min}$ ,  $99\text{ }^{\circ}\text{C}$   $5\text{ min}$  灭活 AMV 酶。

## 2.3 引物设计

参照 GenBank 中尼罗罗非鱼的相关序列  $\beta$ -actin (AY116536)、GH (M26916)、GHR1 (EF052861)、GHR2 (EF052862)、IGF-I (AY9191869), 分别设计各基因的特异性引物 (表 1)。

表 1 荧光实时定量 PCR 分析所用引物

Table 1 Primers used for Real-time quantitative PCR analysis

| 引物               | 序列                          |
|------------------|-----------------------------|
| $\beta$ -actin-F | 5'-GGTGGCTATGGCTCAGAAAGA-3' |
| $\beta$ -actin-R | 5'-GCTGTCGTGAAGGAGTAG-3'    |
| GH-F             | 5'-ATTATCAAAGTCTCGGACGC-3'  |
| GH-R             | 5'-GCTAGGTCTCCACCTTGTGC-3'  |
| IGF-I-F          | 5'-TCTGTGGAGACGAGGCTTT-3'   |
| IGF-I-R          | 5'-CACGTGACCGCCTTGCA-3'     |
| GHR1-F           | 5'-TAAGAAAAGACCTCCTACCA-3'  |
| GHR1-R           | 3'-ACTGTCGCTGAATGTCCAAT-5'  |
| GHR2-F           | 5'-AGCACTGAGACGCCAAACGA-3'  |
| GHR2-R           | 3'-CCAAAGATGAGCAAAGCCAC-5'  |

## 2.4 PCR 扩增

PCR 扩增体系为反转录产物  $2\text{ }\mu\text{L}$ 、 $10\times$  PCR 反应缓冲液  $2\text{ }\mu\text{L}$ 、 $2.5\text{ mmol/L}$  dNTP  $2\text{ }\mu\text{L}$ 、 $0.5\text{ U/}\mu\text{L}$  TaqDNA 酶  $2\text{ }\mu\text{L}$ 、 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$  上下游引物各  $1\text{ }\mu\text{L}$ 、 $15\text{ mmol/L}$   $\text{MgCl}_2$   $2\text{ }\mu\text{L}$ , 补充 DEPC 处理过的水至体积  $20\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件为:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性  $5\text{ min}$ ;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性  $30\text{ s}$ 、 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火  $45\text{ s}$ 、 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $40\text{ s}$ , 共  $36$  个循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $7\text{ min}$ 。

## 2.5 重组标准品质粒制备

PCR 产物经  $1.5\%$  琼脂糖电泳, 按照 E. Z. N. A Gel Extraction Kit 的操作说明对 PCR 扩增片段进行纯化、回收。按照 InsT/Aclone<sup>TM</sup> PCR Product Cloning Kit 载体连接试剂盒的说明书将纯化的 PCR 扩增产物与 pGEMO-R-T 载体在  $T_4$  DNA 连接酶作用下进行连接反应, 构建扩增产物的重组质粒。转化 DH<sub>5</sub> $\alpha$  感受态细胞, 涂于 Amp、X-Gal 和 IPTG 处理的 LB 琼脂平板上,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  过夜培养, 挑取单个白色

菌落, 在 Amp + /LB 液体培养基中  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $200\text{ r/min}$  过夜, 按照质粒快速提取试剂盒的操作要求提取质粒, 然后进行重组质粒 PCR、酶切 (*EcoR* I) 和测序鉴定。

## 2.6 重组质粒定量标准曲线的建立

测定阳性重组质粒的  $A$  值, 计算出拷贝数。将标准品重组质粒进行  $10$  倍系列稀释, 以系列稀释的质粒为模板在荧光实时定量 PCR 仪上扩增。反应体系  $20\text{ }\mu\text{L}$ , Mix  $10\text{ }\mu\text{L}$ 、上下游引物 ( $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ )  $0.4\text{ }\mu\text{L}$ 、重组质粒 DNA  $1\text{ }\mu\text{L}$ 、荧光染料 SYBRGreen I  $0.04\text{ }\mu\text{L}$ 、灭菌双蒸水  $8.2\text{ }\mu\text{L}$ 。Real-time quantitative PCR 反应程序为:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性  $60\text{ s}$ ;  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性  $15\text{ s}$ 、 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火  $15\text{ s}$ 、 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $30\text{ s}$ , 共  $40$  个循环。在每个循环内加入读板步骤, 总延伸结束后, 加入融解曲线的制备 ( $65\sim 95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 每  $0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$  读板  $1$  次) 步骤。

## 2.7 目的基因的定量

使用 ABI PRISM 7900 Sequence Detection System 仪器和 Real-time PCR Master Mix 试剂盒对尼罗罗非鱼  $\beta$ -actin、GH、GHR1、GHR2、IGF-I 基因 cDNA 进行定量。反应体系及程序同 2.6。每个样品重复  $3$  次, 每次都用标准曲线定量出相对应的域值 ( $C_t$ ) 和 cDNA 拷贝数。

## 2.8 数据分析

所有样品重复  $3$  次, 目的基因相对表达量用平均值  $\pm$  标准差表示, 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。

# 3 结 果

## 3.1 标准曲线和融解曲线分析

根据紫外分光光度计测定的重组标准品质粒  $A$  值, 对各质粒  $10$  倍系列稀释, 选取  $6$  个稀释度进行荧光实时定量 PCR 扩增反应, 以  $C_t$  值为纵坐标, 以稀释倍数的对数为横坐标, 获得相对定量标准曲线, 各基因标准曲线的相关系数均大于  $0.995$ , 可见各基因 real-time PCR 在稀释度范围内有很好的线性关系。

PCR 后进行融解曲线分析, 融解曲线结果显示各基因扩增产物均为单峰, 且峰值单一, 表明无引物二聚体及非特异性产物, 扩增产物特异性高。

## 3.2 基因的定量表达

不同样品的反转录产物 cDNA 的定量差异在  $10\%$  ( $n=3$ ) 以内, 同一样品在同一次实时荧光定量结果的差异在  $2\%$  以内。由于看家基因在各种

组织中表达是恒定的, 故以看家基因  $\beta$ -actin 的定量作为标准来比较不同样品目的基因表达量的差异, 即以目的基因/ $\beta$ -actin 来表示目的基因的量。

### 3.2.1 尼罗罗非鱼 GH 基因表达的发育性变化

在尼罗罗非鱼受精卵及所有日龄的仔鱼中均检测到 GH mRNA 表达。GH mRNA 在受精卵和 28、30 日龄的仔鱼中大量表达, 在 7–13 日龄的仔鱼中微量表达, 0–3 日龄仔鱼中等表达; 4–13 日龄仔鱼 GH 的表达逐步降低, 13–24 日龄仔鱼的表达逐步升高, 在 28 日龄时迅速升高到受精卵的表达水平 (图 1)。

### 3.2.2 尼罗罗非鱼 GHRs 基因表达的发育性变化

受精卵和 0–6 日龄仔鱼 GHR1 mRNA 的表达显著高于其他日龄仔鱼, 7–13 日龄仔鱼中未检测到 GHR1 的表达, 15–30 日龄仔鱼 GHR1 表达较低; 与此相反, GHR2 在 7–13 日龄仔鱼中大量表达, 显著高于其他日龄仔鱼, 在受精卵和 0–7 日龄仔鱼中表达逐渐升高, 15 日龄以后 GHR2 表达又逐渐降低 (图 1)。

### 3.2.3 尼罗罗非鱼 IGF-I 基因表达的发育性变化

在尼罗罗非鱼受精卵及所有日龄的仔鱼中均可检测到 IGF-I mRNA 表达。7–10 日龄仔鱼 IGF-I mRNA 表达最高, 3 和 30 日龄仔鱼表达次之, 受精卵和 1 日龄仔鱼表达较低, 其余日龄仔鱼 IGF-I 中等表达, 且表达水平相近 (图 1)。

### 3.2.4 尼罗罗非鱼生长轴相关基因表达的发育性变化规律

从图 6 可以看出, GH 与 GHR1 基因表达的发育性变化趋势比较一致, 在 0–6 日龄时表达水平较高, 在 7–13 日龄时表达极低或检测不到表达, 从 15 日龄起两者表达开始逐渐上升, GH 在 28 日龄时急剧上升, 而 GHR1 在 17 日龄到达一个值后则一直保持较低水平的表达; IGF-I 与 GHR2 基因表达的发育性变化趋势相一致, 0–6 日龄表达呈上升趋势, 7–15 日龄达到较高水平, 随后开始下降。

GH 与 IGF-I 的表达存在一定的互补关系, 7–20 日龄日龄仔鱼 GH 表达极低而 IGF-I 表达水平较高; GHR1 与 GHR2 的表达同样存在互补关系, 0–6 日龄仔鱼 GHR1 高水平表达, GHR2 表达水平较低, 但在 7–13 日龄仔鱼中检测不到 GHR1 的表达, 而 GHR2 则高水平表达 (图 1)。

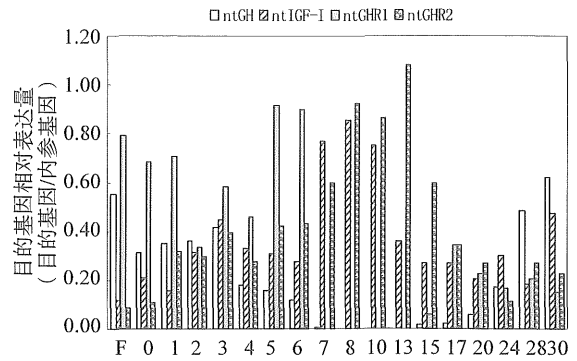


图 1 尼罗罗非鱼生长轴相关基因表达的发育性变化规律 ( $n=3$ )

Fig. 1 Developmental changes of GH, GHRs and IGF-I mRNA in Nile tilapia ( $n=3$ )

## 4 讨论

目前, 国际上对基因表达的检测通用的是荧光定量 PCR 方法, 荧光实时定量 PCR (real-time quantitative PCR) 作为一个极有效的实验方法, 已被广泛地应用于分子生物学研究的各个领域。real-time quantitative PCR 技术较之以前的以终点法进行定量的 PCR 技术具有无与伦比的优势。首先, 它不仅操作简便、快速高效, 而且具有很高的敏感性和特异性。其次, 由于是在封闭的体系中完成扩增并进行实时测定, 大大降低了污染的可能性并且无须在扩增后进行操作。利用实时荧光定量 RT-PCR 对基因的 mRNA 表达水平进行研究非常可靠; 研究结果具有可比性和可重复性<sup>[10]</sup>。本研究对尼罗罗非鱼生长轴相关基因表达情况的检测采用的是荧光染料结合法, 荧光染料是 SYBR Green I, 该染料可在 PCR 产物形成过程中结合到双链 DNA 上, 利用这种染料可以避免使用昂贵的特异性水解探针。但是, SYBR Green I 既可以与特异性的 PCR 产物相结合, 也可与非特异性产物 (如引物二聚体) 相结合。在研究中, 通过优化 PCR 反应条件, 有效地避免了这种情况的发生。

real-time quantitative PCR 根据其定量所选择标准可分为绝对定量及相对定量两大类, 前者是真正意义上的定量 PCR, 它以已知不同浓度的同种模板的系列样品作为外参照标准品, 在相同条件下与待测模板一起进行 PCR 扩增, 通过比较待测样品与标准品的扩增结果, 推断出待测样品中原始模板量<sup>[10]</sup>。近年来 real-time quantitative PCR 尽管得到一定发展, 但由于各实验室采用标准品不一致, 难以纵向比较, 限制着 real-time quantitative PCR 的发

展。标准品的构建可分为3种方式:①化学合成目的基因,它的优点是纯度高、定量准确,缺点是受化学合成工艺的限制,只能合成120 bp以下的长度。②将PCR扩增产物直接梯度稀释,它的优点是方便、简单,缺点是不准确、不稳定,容易造成污染。③将PCR产物克隆到载体上,然后抽出质粒,经过测量浓度和拷贝数的换算,可准确定量,它的优点是稳定、准确。因此,我们选用第3种方式构建标准品。本研究成功构建的标准品质粒和标准曲线是mRNA表达水平定量的基础,对不同样品中基因含量进行定量,进而确定基因表达的水平,为研究尼罗罗非鱼生长轴相关基因的表达提供了一种新的研究手段。

GH在动物早期个体发育和分化过程中起重要作用<sup>[6]</sup>,与幼体出生后的生长、存活密切相关。在虹鳟胚胎、遮目鱼 *Chanos chanos* 卵和1日龄斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides*、2日龄遮目鱼、3日龄黑鲷中检测到GH mRNA的表达<sup>[3-4,8]</sup>,鱼类早期发育过程中GH的表达情况因鱼种而异,存在种的特异性。本研究结果表明在尼罗罗非鱼受精卵中可检测到GH的mRNA表达,与虹鳟和遮目鱼的结果相同。以上这些结果表明,鱼类卵、胚胎和早期仔鱼中存在的GH mRNA及其表达产物GH在其内分泌腺出现功能性分化之前调控鱼类的早期发育过程,是控制鱼类胚胎发育(自分泌或旁分泌)的生长因子之一。

GH通过与其特异受体GHR的结合起作用。GHR是一种能与GH特异、高效结合的膜蛋白,是GH发挥作用的关键所在。资料表明,胎儿期动物血中GH水平较高,但由于缺乏相应的受体,对动物生长发育可能并不重要。鱼类GHR的研究起步较晚,近年来陆续在金鱼 *Carassius auratus*、黑鲷、真鲷、日本鳗鲡、尼罗罗非鱼中克隆到GHR,目前只报道了日本鳗鲡GHR基因在胚胎及仔鱼中表达的发育性变化。日本鳗鲡中存在两种类型的GHR,即eGHR1和eGHR2,在受精卵中可检测到eGHR1 mRNA表达,但检测不到eGHR2 mRNA的表达,在所有仔鱼中均可检测到eGHR1和eGHR2的表达,且随着日龄的增加eGHR1和eGHR2表达呈上升趋势,变态为玻璃鳗后eGHR1和eGHR2的表达极显著升高<sup>[5]</sup>。尼罗罗非鱼中也存在两种类型的GHR,即ntGHR1和ntGHR2,与日本鳗鲡的研究结果不同,在尼罗罗非鱼受精卵中可检测到两种GHR的表达,提示在受精卵中存在的GH mRNA及其表达产物GH可以通过与受体GHR结合来发

挥其促生长发育的重要作用。ntGHR1和ntGHR2在尼罗罗非鱼早期表达中呈现出相反的变化规律,两者出现的峰值和峰谷的时间刚好相反,7-13日龄仔鱼中检测不到ntGHR1的表达,此时ntGHR2的表达量最高,推测两种GHR可能在尼罗罗非鱼早期发育的不同阶段起主要作用。

GH的促生长发育作用除直接作用于靶细胞(GHR)外,主要是通过IGFs介导而实现。IGF-I对动物胚胎及出生后的生长发育有重要作用,肝脏是产生IGF-I的主要场所,但许多组织细胞均可产生IGF-I,从而发挥自分泌、旁分泌作用<sup>[11]</sup>。怀孕7天大鼠胎儿到45日龄大鼠肝脏IGF-I mRNA随(胎)龄增加而增加,之后下降<sup>[12]</sup>;火鸡出壳后,肝脏和大脑IGF-I基因的表达水平逐渐升高,到第3周开始下降<sup>[13]</sup>;羔羊肝脏IGF-I基因的表达随日龄的增加而上升,90天后开始下降<sup>[14]</sup>;其他研究表明,动物到了成年时,IGF-I的分泌量迅速下降<sup>[15]</sup>。以上研究提示,不同动物IGF-I基因表达的发育性变化存在相似的变化规律,但其基因表达的高峰时期,以及下降幅度等存在差异。有关鱼类IGF-I基因在胚胎及仔鱼中表达的研究不多,主要集中在虹鳟和真鲷上<sup>[8-9]</sup>。虹鳟受精后24 h,胚胎中IGF-I的表达呈下降趋势,孵化出膜后13~17 d才恢复到受精起始时表达水平,之后IGF-I表达开始上升<sup>[16]</sup>。本研究结果与虹鳟存在差异,尼罗罗非鱼IGF-I在受精卵及1、2日龄仔鱼中表达较低,3日龄起逐渐升高,在6-10日龄时表达达到峰值,之后开始下降,维持在2-6日龄的表达水平。尼罗罗非鱼和虹鳟IGF-I表达峰值出现的时间存在明显差异,这可能与两种鱼的胚胎发育过程不同相关。

本研究还发现,尼罗罗非鱼在早期发育过程中,GH与IGF-I,GHR1与GHR2的表达均存在一定的互补性,且GH与GHR1的表达变化趋势一致。7-13日龄仔鱼,GH表达极低,GHR1检测不到表达,而此时GHR2表达量最高。根据尼罗罗非鱼早期发育的观察得知,7日龄时仔鱼卵黄囊完全消失,因而推测在受精卵和0-7日龄仔鱼中检测到的GH mRNA表达可能主要是母源的GH,到了7日龄卵黄囊耗尽时,则母源的GH随之消失,而此时仔鱼自身垂体才开始合成分泌GH,但表达量低。在这个阶段,仔鱼IGF-I mRNA表达极高,则同其合成的IGF-I可能对仔鱼的生长发育起主要作用,以弥补GH的不足。另外,GH的表达与GHR1的表达呈显著正相关,而与GHR2的表达无

明显相关性, 提示 GH 可能主要通过 GHR1 的结合起作用, GHR2 作为一种在鱼类中新发现的基因, 其生物学功能有待进一步深入研究。

总之, 在尼罗罗非鱼的胚胎和早期发育中, GH 和 IGF-I 都起着不可忽视的作用, 两者可能在不同的时期发挥主导作用; GH 可能主要是通过与 GHR1 的结合发挥其促生长发育的作用。

#### 参考文献:

- [1] DE PABLO F, ROTH J. Endocrinization in early embryos: An emerging role for hormones and growth - like factors[J]. Trends Biochem Sci, 1990, 15:339 - 342.
- [2] TAGAWA M. Current understanding of the presence of hormones in fish eggs[M]// WATANABE Y, YAMSHITA Y, OZEKI Y. Survival strategies in early life stage of marine resources. AA Balkema: Rotterdam, 1996: 27 - 38.
- [3] DE JESUS E G T, AYSON F G, AMEMIYA Y, et al. Milkfish (*Chanos chanos*) growth hormone cDNA cloning and mRNA expression in embryos and early larval stages[J]. Aquaculture, 2002, 208:177 - 188.
- [4] LI W S, CHEN D, WONG A O L, et al. Molecular cloning, tissue distribution, and ontogeny of mRNA expression of growth hormone in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. Gen Comp Endocrinol, 2005, 144:78 - 89.
- [5] OZAKI Y, FUKADA H, TANAKA H, et al. Expression of growth hormone family and growth hormone receptor during early development in the Japanese eel(*Anguilla japonica*) [J]. Comp Biochem Physiol, 2006, 145(1):27 - 34.
- [6] SANDERS E J, HARVEY S. Growth hormone as an early embryonic growth and differentiation factor[J]. Anat Embryol, 2004, 209:1 - 9.
- [7] ZHAO J, TAVERNE M A M, VAN DER WEIJDEN G C, et al. Immunohistochemical localisation of growth hormone (GH), GH receptor (GHR), insulin-like growth factor (IGF-I) and type I IGF-I receptor, and gene expression of GH and GHR in rat pre-antral follicles[J]. Zygote, 2002, 10: 85 - 94.
- [8] FUNKENSTEIN B, SHEMER R, AMULY R, et al. Nucleotide sequence of the promoter region of *Sparus aurata* insulin-like growth factor I gene and expression of IGF-I in eggs and embryos [J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1996, 5: 43 - 51.
- [9] GREENE M W, CHEN T T. Temporal expression pattern of insulin-like growth factor mRNA during embryonic development in a teleost, rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) [J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1997, 6: 144 - 151.
- [10] TICHOPAD A, PFAFFL M W, DIDIER A. Tissue-specific expression pattern of bovine prion gene: quantification using real-time RT-PCR [J]. Mol Cell
- [11] MENUELLE P, BABAJKO S, PLAS C. Insulin-like growth factor (IGF) binding proteins modulate the glucocorticoid dependent biological effects of IGF in cultured fetal rat hepatocytes [J]. Endocrinology, 1999, 140(5):2232 - 2240.
- [12] PENG M, PELLETIER G, PALIN M F, et al. Ontogeny of IGFs and IGF-BPs mRNA levels and tissue concentrations in liver, kidney and skeletal muscle of pig[J]. Growth Development and Aging, 1996, 60(3 - 4): 171 - 187.
- [13] RICHARDS M, POCH S, CLARKE S, et al. Expression of insulin-like growth factor gene in liver and brain tissue during embryonic and post-hatch development of the turkey [J]. Poultry Science, 2003, (82) (Suppl. 1):81.
- [14] 刘国庆, 黄治国, 刘振山, 等. 羔羊肝脏 IGF-I 和 IGF-IR 基因表达的发育性变化研究[J]. 中国农业科学, 2006, 39(12):2277 - 2281.
- LIU Guoqing, HUANG Zhiguo, LIU Zhengshan, et al. Studies on the developmental patterns of IGF-I and IGF-I R gene expression in liver tissue of lamb [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(12):2277 - 2281.
- [15] RAO R K, PHILIPPS A F, WILLIAMS C S, et al. Luminal stability of insulin-like growth factors 1 and 2 in developing rat gastrointestinal tract[J]. Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition, 1998, 26: 179 - 185.
- [16] LI M, GREENAWAY J, RAINE J, et al. Growth hormone and insulin-like growth factor gene expression prior to the development of the pituitary gland in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos reared at two temperatures[J]. Comp Biochem Physiol B, 2006, 143: 514 - 522.