



卵形鲳鲹促性腺激素 β 亚基的 克隆鉴定及其受雌二醇的调控*

黄春艳, 陈华谱, 郭煜文, 王岩, 杨浩, 李广丽

广东省名特优鱼类生殖调控与繁育工程技术研究中心 / 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室 / 广东省海水养殖生物育种工程实验室 / 广东海洋大学水产学院, 广东湛江 524088

摘要: 促性腺激素(GtH, gonadotropin hormone)是垂体合成和分泌的一类重要糖蛋白激素, 包括促卵泡生成素(Fsh, follicle stimulating hormone)和促黄体生成素(Lh, luteinizing hormone), 在促进性腺发育和成熟过程中发挥重要作用。本研究成功克隆了卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)*fsh β* 和*lh β* 基因的开放阅读框(ORF, open reading frame)序列, *fsh β* ORF长度为363 bp, *lh β* ORF长度为447 bp。通过荧光定量PCR技术(qPCR, quantitative real-time PCR)检测, 发现*fsh β* 和*lh β* 基因在卵形鲳鲹的下丘脑-垂体-性腺轴(HPG, hypothalamus-pituitary-gonadal axis)显著表达, 在垂体中的表达水平最高, 其次是下丘脑和性腺。此外, 通过体外实验评估17 β -雌二醇(E2, 17 β -estradiol)对卵形鲳鲹垂体组织中*fsh β* 和*lh β* 基因表达的影响。结果显示, 10 μ mol/L E2处理6 h后, GtH β 亚基基因的表达被极显著抑制。最后, 使用雌激素受体(ER, estrogen receptor)拮抗剂体外孵育卵形鲳鲹垂体组织, 发现广谱性拮抗剂Fulvestrant、ER β 拮抗剂Cyclofenil和ER α 拮抗剂MPP(MPP dihydrochloride)均能够消除E2对GtH β 亚基基因表达的抑制作用。综上所述, 研究结果表明E2对卵形鲳鲹GtH的分泌具有负反馈调节作用, 为卵形鲳鲹生殖调控机制提供了有价值的见解。

关键词: 卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*); 促性腺激素(GtH); 雌激素受体(ER); 17 β -雌二醇(E2)

中图分类号: S965.3 文献标志码: A 文章编号: 2097-0137(2025)01-0172-10

Cloning and characterization of gonadotropin β subunit genes in pompano (*Trachinotus ovatus*) and their regulation by estradiol

HUANG Chunyan, CHEN Huapu, GUO Yuwen, WANG Yan, YANG Hao, LI Guangli

Guangdong Province Famous Fish Reproduction Regulation and Breeding Engineering Technology Research Center of Engineering Technology Research Center / Guangdong Province Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology of Aquatic Economic Animals / Guangdong Province Marine Aquaculture Biological Breeding Engineering Laboratory / Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

Abstract: Gonadotropin hormones (GtH) are a crucial class of glycoprotein hormones synthesized and secreted by the pituitary, playing a pivotal role in promoting gonadal development and maturation.

* 收稿日期: 2024-07-07 录用日期: 2024-08-12 网络首发日期: 2024-10-22

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目(2021B0202020002); 湛江市科技计划项目(2022A01214);

阳江市科技计划项目(2022011, SDZX2023027, SDZX2021041);

广东省现代化海洋牧场适养品种核心技术攻关项目(2024-MRB-00-001)

作者简介: 黄春艳(2000年生), 女; 研究方向: 鱼类生理; E-mail: 2112201146@stu.gdou.edu.cn

通信作者: 陈华谱(1983年生), 男; 研究方向: 鱼类生殖生长及性别调控;

E-mail: chenhp@gdou.edu.cn

全文阅读



ZR20240224

In this study, we successfully cloned the open reading frame (ORF) sequences of *fsh β* and *lh β* from pompano (*Trachinotus ovatus*), with *fsh β* ORF length of 363 bp and *lh β* ORF length of 447 bp. Using quantitative real-time PCR (qPCR), we observed expression of *fsh β* and *lh β* in various tissues of pompano, with the highest levels detected in the pituitary followed by the hypothalamus. Furthermore, *in vitro* experiments were conducted to assess the effect of 17 β -estradiol (E2) on *fsh β* and *lh β* expression in pompano pituitary. Results showed a significant inhibition of *fsh β* and *lh β* expression after 6 h of treatment with 10 μ mol/L E2. Lastly, using estrogen receptor (ER) antagonists for *in vitro* incubation of pompano pituitary tissue, we demonstrated that broad-spectrum antagonist Fulvestrant, ER β antagonist Cyclofenil, and ER α antagonist MPP dihydrochloride could alleviate the inhibitory effect of E2 on *fsh β* and *lh β* expression. Overall, our findings suggest a negative feedback regulation of E2 on GtH secretion in pompano, providing valuable insights into the reproductive regulation mechanism of pompano.

Key words: pompano (*Trachinotus ovatus*); gonadotropin hormones (GtH); estrogen receptor (ER); 17 β -estradiol (E2)

促性腺激素 (GtH, gonadotropin hormone) 在鱼类生殖调控系统中扮演着关键的角色, 其参与下丘脑-垂体-性腺轴 (HPG, hypothalamus-pituitary-gonadal axis) 的调节, 对性腺发育和繁殖功能的维持至关重要。下丘脑启动促性腺激素释放激素 (GnRH, gonadotropin-releasing hormone) 的合成, 进而刺激垂体合成和释放 GtH, 包括促卵泡生成素 (Fsh, follicle stimulating hormone) 和促黄体生成素 (Lh, luteinizing hormone), 随后通过血液循环作用于性腺, 进而调节性腺功能 (Hollander-Cohen et al., 2021)。研究表明, 鱼类的 Fsh 和 Lh 在功能上存在差异, 两者由不同的 β 亚基和相同的 α 亚基组成。Fsh 主要促进配子的产生和发育, 而 Lh 则在配子的最终成熟过程中发挥作用 (Banerjee et al., 2008)。具体而言, *fsh β* 基因表达水平在卵黄形成期上升, 并在产卵前一直保持较高水平。而 *lh β* 基因表达则在成熟期达到峰值, 这种趋势在卵巢发育同步的物种中较为常见 (Candelma et al., 2017)。例如, 通过对虹鲟 (*Oncorhynchus mykiss*) 和大麻哈鱼 (*Oncorhynchus rhodurus*) 血清以及垂体 GtH 进行放射免疫检测, 发现在性腺不同发育阶段, GtH 的含量存在显著差异; 在精子形成和卵黄生成期间, 血清中 Fsh 的含量显著高于 Lh, 而在排卵和精子释放期间, 血清中 Lh 的含量显著高于 Fsh (Suzuki et al., 1988)。因此, Fsh 主要在鱼类性腺发育的早期起作用, 可能涉及雌二醇等性类固醇激素的调节, 进而影响性腺的发育和配子的生成, 而 Lh 则主要促使卵母细胞和精子的最终成熟, 并刺激排精和排卵。

性类固醇激素是一类甾体激素, 通过与特异性雄激素或雌激素受体相互作用, 调节机体性腺发育 (朱妍等, 2023)。这些激素向大脑和垂体提供反馈, 对 HPG 轴进行调节, 影响促性腺激素的合成和分泌 (Levavi-Sivan et al., 2010; Fontaine et al., 2020)。17 β -雌二醇 (E2, 17 β -estradiol) 作为最常见的类固醇激素, 在脊椎动物的生长和发育等多种生理过程中扮演着重要角色 (Yan et al., 2011; Cleveland et al., 2016)。大量研究报道了 E2 对 *lh β* 和 *fsh β* 基因的表达具有直接影响 (Lin et al., 2009; Singh et al., 2009; Avtanski et al., 2014; Li et al., 2018)。尽管在不同鱼类中探索了 E2 与 Lh 和 Fsh 之间的相互作用, 但性类固醇激素对细胞内过程的确切影响及其对 Lh 或 Fsh 的调节机制仍未完全阐明。已有研究表明, E2 能够在体内和体外诱导青春草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 垂体中 *lh β* mRNA 的表达及分泌 (Qin et al., 2018)。在其他硬骨鱼类中也观察到了类似的作用, 如大西洋黄花鱼 (*Micropogonias undulatus*) (Banerjee et al., 2008)、日本鳗鱼 (*Anguilla japonica*) (Jeng et al., 2007) 和马苏大麻哈鱼 (*Oncorhynchus masou*) (Ando et al., 2004)。然而, 在鲑科鱼类、鲤科鱼类、鲑形目和鲈形目鱼类中, E2 对 Lh 的生成和释放呈现负反馈效应 (Aroua et al., 2007)。此外, E2 可以在体内和体外诱导金鱼 (*Carassius auratus*) (Huggard-Nelson et al., 2002) 和鳗鱼 (*Anguilla anguilla*) (Aroua et al., 2007) *fsh β* mRNA 的表达, 而在银鲑 (*Oncorhynchus kisutch*) (Larsen et al., 1997) 和虹鲟鱼 (Saligaut et al., 1998) 中, 类固醇激素对 Fsh 释放呈现负反馈效

应。综上所述,类固醇激素对不同鱼类 GtH 反馈调节机制仍有待进一步确定,需要进行更深入的研究。

卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)属硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲈形目(Perciformes)、鲹科(Carangidae),是一种重要的海水养殖鱼类。其广泛分布在印度洋、太平洋、大西洋等热带、亚热带和温带海域(李远友等,2019),是中国东海、南海、台湾海峡等地区主要的经济养殖鱼类之一,具有良好的发展前景(Guo et al., 2021)。卵形鲳鲹体高而侧扁,尾柄细短,因其无肌间刺、肉质细嫩、鲜美可口且营养价值高,而深受消费者青睐(郭萌萌等, 2018)。目前,卵形鲳鲹的研究主要集中在病害、饵料、代谢、人工养殖和育苗技术等方面(区又君, 2005;夏立群等, 2012;林川等, 2017; Wang et al., 2022; Zhao et al., 2022)。GtH 作为鱼类生殖内分泌调节的研究热点(Candelma et al., 2017),在卵形鲳鲹中与 GtH 相关的研究却鲜有报道,并且其与生殖轴的反馈调节机制尚未完全阐明。因此,深入探究 GtH 在卵形鲳鲹内分泌中的调控作用及其反馈调节机制显得尤为迫切。

本研究成功克隆了卵形鲳鲹的 *fsh β* 和 *lh β* 基因的 ORF 序列,并对其进行了序列分析和表达研究。同时,通过使用 E2 及其受体拮抗剂对卵形鲳鲹垂体组织进行了体外培养,旨在探讨性激素对 GtH 的反馈调节机制,为进一步完善卵形鲳鲹的生殖调控提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

卵形鲳鲹购自霞山市场(中国湛江),质量 400~600 g。E2 购自 GL Biochem(吉尔生化,中国上海)。Fulvestrant(HY-13636,纯度 98%)、MPP dihydrochloride(HY-103454,纯度 97%)和 Cyclofenil(HY-W011100,纯度 98%)购自 MedChemexpress(MCE,美国新泽西)。E2 溶于无水乙醇; Fulvestrant、MPP dihydrochloride 和 Cyclofenil 溶于二甲基亚砜(DMSO)中。所有动物实验均经广东海洋大学水产学院动物研究与伦理委员会批准。

1.2 RNA 提取及反转录

实验所用卵形鲳鲹($n = 6$)经 MS-222 麻醉剂(Sigma,美国密苏里)麻醉后解剖,收集下丘脑、垂体、肝脏、肾脏、脾脏、胃、性腺、心脏、肌肉、鳃和肠组织,在液氮中冷冻,并储存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。使用 Trizol 试剂(Invitrogen,美国加利福尼亚)从各种

组织中分离总 RNA,通过 $w = 1.5\%$ 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 样品的完整性, Nanodrop 2000 分光光度计(Thermo Scientific,美国马萨诸塞)评估 RNA 的质量和浓度。最后,使用 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser(Takara,日本大阪)进行 cDNA 合成,产物保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.3 克隆和测序

利用美国国家生物技术信息中心(NCBI)网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)查找了卵形鲳鲹 *fsh β* 和 *lh β* 的开放阅读框(ORF, open reading frame)序列,引物使用 Primer Premier Software v5.0 进行设计,并列于表 1 中。以反转录产物为模板进行 PCR(BIO-RAD-C1000,美国加州)扩增。PCR 反应条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,此过程共进行 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 复延伸 10 min。并通过 $w = 1.5\%$ 琼脂糖凝胶电泳验证 PCR 产物。提取特定片段并将其克隆到 *pEASY-T3* 载体(全式金,中国北京)中,筛选阳性结果送生工生物工程(中国上海)测序。

1.4 序列分析及进化树的构建

利用 ORF finder 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>),预测 ORF 及其编码的氨基酸序列。利用 Expasy 网站(https://www.detaibio.com/sms2/protein_mw.html)计算其相对分子质量、理论等电点(pI)等基本信息。利用网站 softberry(<http://www.softberry.com/>)对该蛋白的糖基化位点进行预测。使用 SignalP 5.0 网站(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测信号肽序列。使用 MEGA 6.0 软件的邻接法(Neighbor-Joining method)构建系统进化树。

1.5 卵形鲳鲹 *fsh β* 和 *lh β* 的组织分布

根据已获得的卵形鲳鲹 *fsh β* 和 *lh β* 序列设计并合成用于 qPCR 的引物,结果参见表 1。使用 PerfectStartTM Green qPCR SuperMix(全式金,中国北京)进行 qPCR,在高通量实时荧光定量 PCR 仪 Light Cycler 480(Roche,瑞士巴塞尔)上进行 qPCR 实验。反应条件如下: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s,共 40 个循环(收集信号);最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min。本研究中的参考基因是 *β -actin*(Ren et al., 2022),根据阈值周期值测量相对表达式,并用公式 $R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算(Livak et al., 2001)。

1.6 E2 进行垂体组织体外孵育

从卵形鲳鲹中取出垂体组织,并用 M-199 培养基(Gibco,中国上海)洗涤 3 次。然后将垂体组织分散成组织碎片,转移到 24 孔培养板中。每孔含有

表1 卵形鲳鲹 *fsh β* 和 *lh β* 基因克隆及 qPCR 的引物
Table 1 Cloning and qPCR primers of *fsh β* and *lh β* genes in pompano

基因	引物	序列 (5'-3')	目的
<i>fshβ</i>	<i>fsh</i> -F	CAGAGGATGCAGCTGGTTGTC	克隆
	<i>fsh</i> -R	GAGGATTTTCTTTAAAAAGAC	克隆
<i>lhβ</i>	<i>lh</i> -F	GACTATGGCTGTACAGGTCAG	克隆
	<i>lh</i> -R	GACTAGTAGTAGAACGGTATG	克隆
<i>fshβ</i>	<i>fsh</i> -Q-F	CAGCAGTGTGGCAGTGGCG	qPCR
	<i>fsh</i> -Q-R	GGTAGATGACACCCTCTGGACA	qPCR
<i>lhβ</i>	<i>lh</i> -Q-F	CTCTGGAGAAGGAGGGCTGC	qPCR
	<i>lh</i> -Q-R	AGCCACAGGGTAGGTGACGGTAGG	qPCR
β -actin	β -actin-F	GAGAGGTTCCGTTGCCAGAG	内参基因
	β -actin-R	CAGACAGCACAGTGTGGCGT	内参基因

2 mL M-199培养基, 其中含有青霉素(100 IU/mL)和链霉素(100 μ g/mL)。将组织碎片与 $\varphi=5\%$ 的CO₂在25 °C下预孵育2 h。预孵育后, 取出培养基并分别用含有0.1、1和10 μ mol/L E2的新鲜培养基代替。对照组(不带E2)和实验组同时孵育。每组做3个重复, 孵育3、6和12 h后, 收集所有组织碎片进行RNA提取。

1.7 E2和ERs拮抗剂进行垂体组织体外孵育

将卵形鲳鲹解剖取出垂体组织, 并用M-199培养基洗涤3次, 分散成组织碎片, 然后转移到24孔培养板中。预孵育后, 取出培养基, 用含有E2和ERs拮抗剂的新鲜培养基代替。垂体组织碎片用E2 + Fulvestrant, E2 + MPP dihydrochloride和E2 + Cyclofenil处理。各组E2的浓度均为10 μ mol/L, Fulvestrant、MPP dihydrochloride和Cyclofenil的浓度都为1、10和100 μ mol/L。孵育6 h后, 收集组织碎片进行RNA提取。

1.8 统计分析

数据显示为平均值 \pm 标准误差(mean \pm SEM)。通过单因素方差分析(ANOVA)检验组间数据的显著差异, 然后进行Duncan事后检验。概率水平低于0.05($P < 0.05$)表示具有显著性差异, 概率水平低于0.01($P < 0.01$)表示具有极显著性差异。所有统计检验均使用统计分析软件SPSS 22 (SPSS, 美国)进行分析。使用GraphPad Prism 8.0.2作图。

2 结果

2.1 克隆和序列分析

卵形鲳鲹 *fsh β* cDNA 序列的 ORF 长为 363 bp,

编码 120 个氨基酸, 相对分子质量为 13 090, 理论等电点(pI)为 5.39, 此外, 在 Fsh β 氨基酸序列中含有一个 N-糖基化位点为 NISV。预测 Fsh β 前体具有一个由 17 个氨基酸组成的信号肽。*lh β* cDNA 序列的 ORF 长为 447 bp, 编码 148 个氨基酸, MW 为 16 550, pI 为 5.38, 在 Lh β 氨基酸序列中也含有一个 N-糖基化位点为 NQTV。预测 Lh β 前体具有一个由 31 个氨基酸组成的信号肽。

2.2 卵形鲳鲹 Fsh β 和 Lh β 系统进化树分析

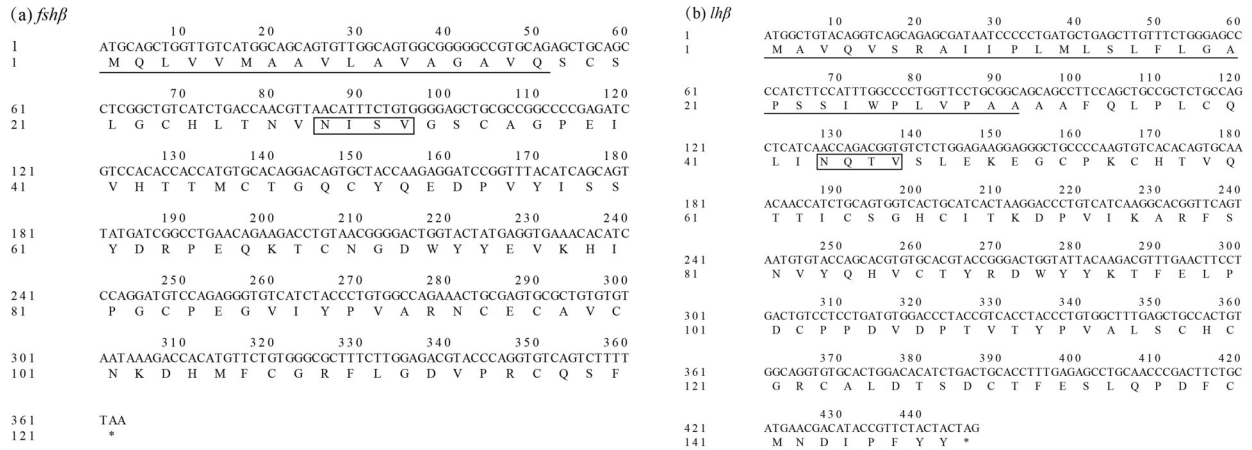
运用邻位相连算法构建卵形鲳鲹与其他脊椎动物 Fsh β 和 Lh β 的系统进化树, 以确定卵形鲳鲹 Fsh β 和 Lh β 的进化关系。结果表明, 脊椎动物 Fsh β 聚类为一个独立的进化分支, 而 Lh β 则聚类为另一个独立进化分支。其中卵形鲳鲹 Fsh β 与军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) 和黄尾鲷鱼 (*Seriola lalandi*) 等鱼类亲缘关系较近, Lh β 与盲曹鱼 (*Lates calcarifer*)、尼罗尖吻鲈 (*Lates niloticus*) 和高体鲷 (*Seriola dumerili*) 等鱼类亲缘关系较近 (图 2)。

2.3 卵形鲳鲹 *fsh β* 和 *lh β* 的组织分布

利用 qPCR 技术检测 *fsh β* 和 *lh β* 基因在卵形鲳鲹不同组织中的表达模式 (图 3)。本研究结果表明, 两者均在卵形鲳鲹垂体中的表达量最高, 其次是下丘脑。此外, *fsh β* 在性腺中的表达量较高, 在其他组织中的表达量较低。

2.4 E2 体外孵育卵形鲳鲹垂体对 *fsh β* 和 *lh β* mRNA 表达的影响

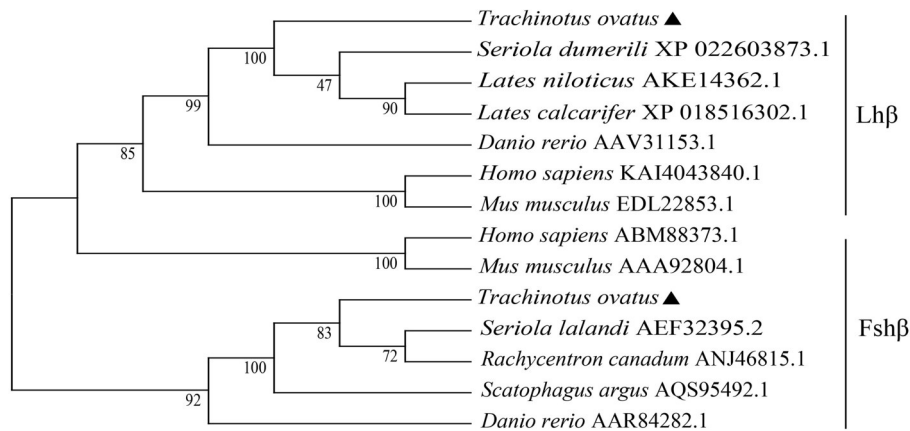
E2 体外孵育卵形鲳鲹垂体结果显示, 0.1 μ mol/L 的 E2 在孵育 3 h 后, 显著抑制了 *fsh β* 的表达。在处理 6 h 后, 0.1 μ mol/L 和 1 μ mol/L 的 E2 显著地抑制了垂体中 *fsh β* 的表达, 10 μ mol/L 的 E2 极显著



下划线为信号肽; 方框为 N-糖基化位点; *为终止密码子。

图 1 卵形鲳鲹 *fshβ* 和 *lhβ* 的 ORF 序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 The ORF sequences of pompano *fshβ* and *lhβ* and their deduced amino acid sequences



各物种的 NCBI 登录号分别为

Fshβ: *Rachycentron canadum* ANJ46815.1, *Seriola lalandi* AEF32395.2, *Scatophagus argus* AQS95492.1, *Danio rerio* AAR84282.1, *Homo sapiens* ABM88373.1, *Mus musculus* AAA92804.1;
 Lhβ: *Lates calcarifer* XP_018516302.1, *Lates niloticus* AKE14362.1, *Seriola dumerili* XP_022603873.1, *Danio rerio* AAV31153.1, *Mus musculus* EDL22853.1, *Homo sapiens* KAI4043840.1。

图 2 Fshβ 和 Lhβ 系统进化树

Fig. 2 The phylogenetic tree of Fshβ 和 Lhβ

地抑制了 *fshβ* 的表达, 处理 12 h 后, 仅 0.1 μmol/L 的 E2 对 *fshβ* 有显著影响。处理 6 h 后, 3 种浓度的 E2 都极显著地抑制了垂体中 *lhβ* 的表达, 而处理 3 和 12 h, E2 对 *lhβ* mRNA 的表达均没有显著影响。

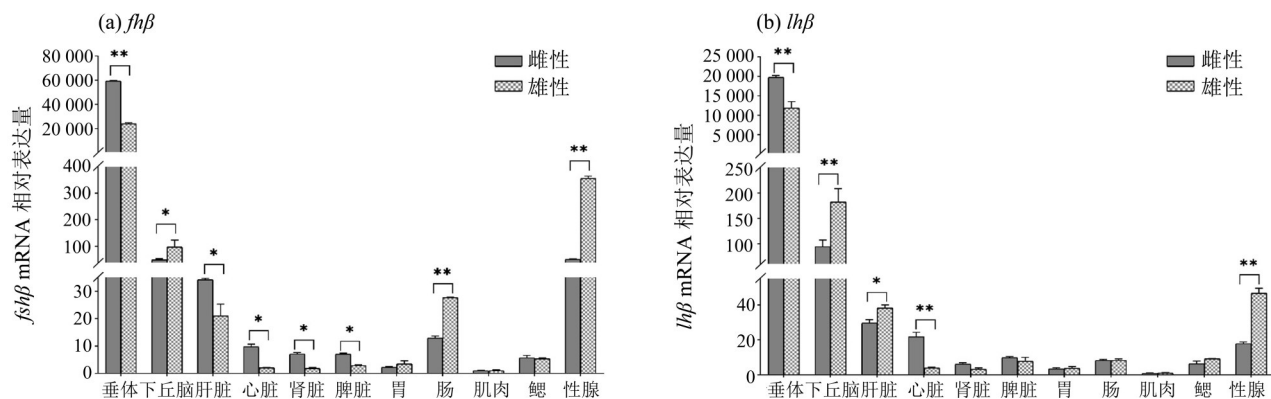
2.5 E2 及 ERs 拮抗剂体外孵育卵形鲳鲹垂体对 *fshβ* 和 *lhβ* mRNA 表达的影响

E2 联合 ERs 拮抗剂离体孵育卵形鲳鲹垂体, 结果显示, 加入 Fulvestrant、MPP dihydrochloride 和 Cyclofenil 均可显著减弱 E2 处理对 *fshβ* 和 *lhβ* 的下调作用, Fulvestrant 处理对减弱 *fshβ* 的下调作用

呈剂量依赖性, 10 和 100 μmol/L 可极显著地减弱 *lhβ* 的下调作用。而 Cyclofenil 仅在 100 μmol/L 时对减弱 *fshβ* 和 *lhβ* 的下调作用具有极显著差异。MPP dihydrochloride 也仅在 100 μmol/L 时对减弱 *fshβ* 的下调作用有极显著差异, 而在 10 和 100 μmol/L 时都极显著地减弱了 *lhβ* 的下调作用。

3 讨论

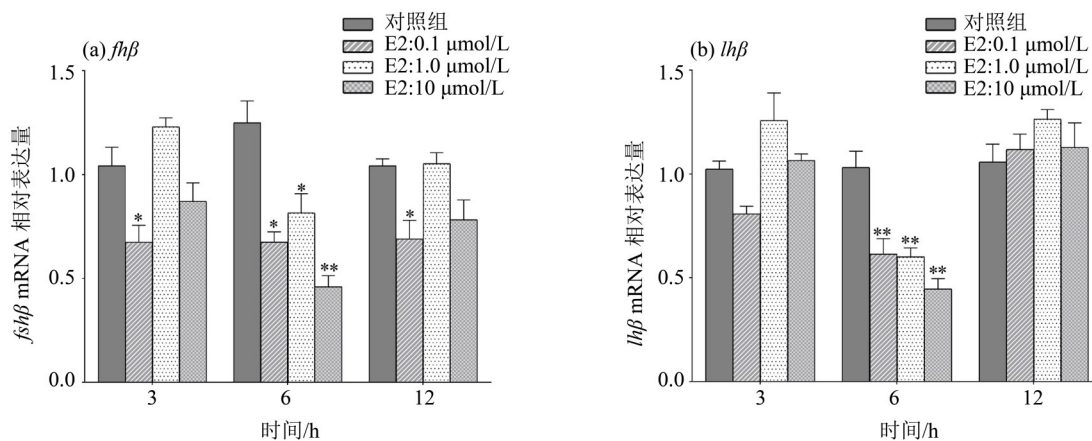
GtH 是一种重要的生殖调控激素, 在调节性类固醇激素的分泌、启动生殖周期、促进生殖细胞的产生、成熟和排放等方面发挥着至关重要



数据以平均值±平均标准误差表示($n=6$), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 卵形鲳鲹中 $fsh\beta$ 和 $lh\beta$ 的组织分布

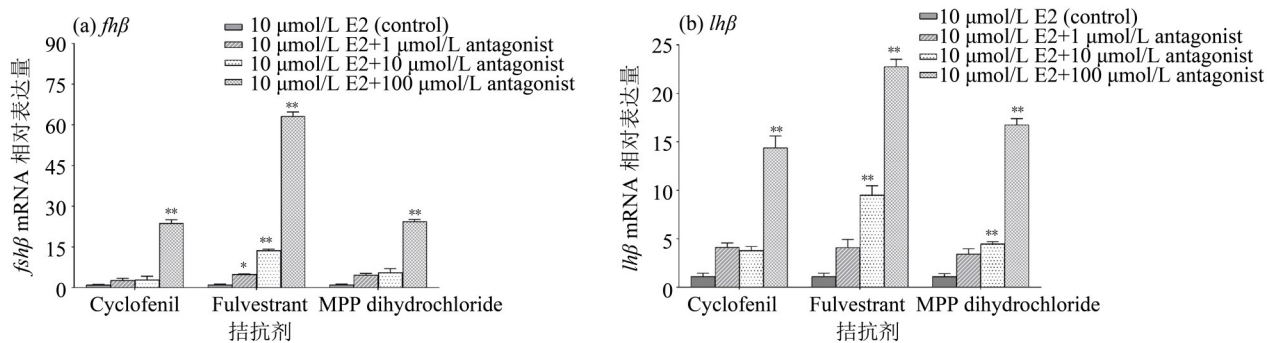
Fig. 3 Tissue expression of $fsh\beta$ and $lh\beta$ in pompano



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 4 E2 体外孵育对卵形鲳鲹垂体 $fsh\beta$ 和 $lh\beta$ 表达的影响($n=3$)

Fig. 4 *In vitro* effects of E2 on pituitary $fsh\beta$ and $lh\beta$ expression in pompano ($n=3$)



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 5 E2 及 ERs 拮抗剂体外孵育对卵形鲳鲹垂体 $fsh\beta$ 和 $lh\beta$ 表达的影响($n=3$)

Fig. 5 *In vitro* effects of E2 and ERs antagonists on pituitary $fsh\beta$ and $lh\beta$ expression in pompano ($n=3$)

要的作用(周兰等, 2005)。目前, 已有多种硬骨鱼类的 GtH 亚基的编码基因被克隆和分析, 例如半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) (Shi et al.,

2015)、高体鲈 (*Nyuji et al., 2016*)、边尾平鲈 (*Sebastes taczanowskii*) (Yamaguchi et al., 2021) 和日本鲈鱼 (*Lateolabrax japonicas*) (Chi et al., 2015) 等。

本研究成功克隆了卵形鲳鲹 *fsh β* 和 *lh β* 基因的 ORF 序列, 长度分别为 363 和 447 bp, 分析发现 Fsh 和 Lh 蛋白均含有一个 N-糖基化位点, 这与其他鱼类的研究结果一致(陈圣毅等, 2014; 杨国坤等, 2016)。N-糖基化位点在蛋白质的生物合成、稳定性、细胞内运输和亚细胞定位等生物学过程中发挥着关键作用, 确保了激素的生物学效力(Wang et al., 2020)。此外, 系统进化树结果显示, Fsh 与军曹鱼和黄尾鲷等鱼类有较近的亲缘关系, 而 Lh 与盲曹鱼和高体鲷等鱼类有较近的亲缘关系, 与哺乳动物的亲缘关系较远, 符合传统的分类学地位。

本研究对卵形鲳鲹的 11 个组织中 *fsh β* 和 *lh β* 基因的表达水平进行了检测。结果显示, 卵形鲳鲹的 *fsh β* 和 *lh β* 基因在 HPG 轴中显著表达, 其中在垂体中表达水平最高, 其次是下丘脑和性腺。此外, 在其他组织中也有不同程度的表达。类似地, 在斑马鱼(So et al., 2005)和金头鲷(*Sparus aurata*)(Meiri et al., 2004)中, *fsh β* 和 *lh β* 也在垂体中具有较高的表达。此外, 在其他鱼类中, 例如斑马鱼的肾、肝脏等组织(So et al., 2005), 半滑舌鳎(Shi et al., 2015)、南方鲇(*Silurus meridionalis*)(Wu et al., 2009)和大西洋鳕(*Gadus morhua*)(Mittelholzer et al., 2009)的卵巢中也检测到 *fsh β* 和 *lh β* 的表达。这表明, *fsh β* 和 *lh β* 在鱼类的多种组织中广泛表达是一种普遍现象, 暗示了 GtH 可能参与调节鱼类的多种生理过程。然而, GtH 在其他组织中的具体作用仍需进一步的实验探究。

现有研究表明, 类固醇激素对 GtH 的合成和分泌具有双重调控作用。在人类、鸟类和鱼类中观察到, 当机体内性激素水平低于正常值时, 存在正反馈调节机制, 从而促进 Lh 的分泌; 然而, 当性激素水平较高时, 则会抑制 GtH 合成释放及其编码基因的表达, 呈现负反馈调节机制(胡健饶, 2001)。在垂体水平上, E2 可直接刺激青春期早期斑马鱼垂体原代培养细胞中 *lh β* 的表达(Li et al., 2018), 在黄花鱼和日本鳗鱼中, 通过注射 E2 短时间刺激后, 检测其垂体中 *lh β* 的表达水平, 发现 E2 可以显著促进 *lh β* mRNA 的表达(Jeng et al., 2007; Banerjee et al., 2008)。这些研究结果表明, 在性未成熟鱼类中, 雌激素对 Lh 的合成和释放呈现正反馈作用。成熟的虹鳟鱼中, 发现注射 E2 会降低循环 Lh 水平(Billard et al., 1977), 雌性和雄性成熟鲑鱼在经过 E2 处理后体内也出现了负反馈(Dickey et al., 1998)。在成熟期的欧洲鲈

(*Dicentrarchus labrax*)(Mateos et al., 2002)、金鱼(Akito Kobayashi et al., 2000)和银大麻哈鱼(Dickey et al., 1998)等鱼类研究中, 雌激素也表现出负反馈作用。本研究发现, 不同浓度的 E2 对卵形鲳鲹 *fsh β* 和 *lh β* mRNA 的表达有不同程度的抑制作用。体外孵育卵形鲳鲹的垂体组织 3 h 后, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的 E2 显著抑制了 *fsh β* mRNA 的表达。体外孵育 6 h 后, 3 种浓度的 E2 以剂量依赖的方式显著抑制 *fsh β* 和 *lh β* mRNA 的表达。然而, 在处理 12 h 后, 低浓度的 E2 显著抑制了 *fsh β* mRNA 的表达, 中浓度和高浓度不影响 *fsh β* mRNA 的表达, 推测 E2 的浓度可能影响其反馈调控机制。而经过长时间处理, 中浓度和高浓度 E2 对 *fsh β* 和 *lh β* mRNA 的表达没有显著影响, 这可能是垂体对 E2 的敏感性降低, 存在“脱敏反应”。之前在牛蛙(*Rana catesbeiana*)(McCreery et al., 1982)和虎纹蛙(*Hoplobatrachus rugulosus*)(李远友等, 1998)中也报道了类似的现象, 当用高浓度的 GnRH 长期刺激垂体, 会降低 GtH 分泌细胞对 GnRH 的敏感性, 即产生脱敏反应。

E2 主要通过雌激素受体对 GtH 的合成和释放发挥反馈调节作用, 这在多种硬骨鱼中观察到(Mommsen et al., 1986; Menuet et al., 2004; Marlatt et al., 2008; Davis et al., 2009; Dominguez et al., 2014)。E2 能够显著抑制下丘脑中 *gnrh* mRNA 的表达, 但这种抑制作用可以被 ERs 拮抗剂消除(Ng et al., 2009)。研究结果表明, 高浓度 E2 能够在体外抑制卵形鲳鲹垂体中 *fsh β* 和 *lh β* mRNA 的表达。此外, 通过使用 3 种 ER 拮抗剂进一步证实了 E2 通过 ERs 抑制卵形鲳鲹垂体组织中 *fsh β* 和 *lh β* 的表达。目前用于抑制雌激素受体的拮抗剂主要有 3 种。Fulvestrant 是一种广谱雌激素受体拮抗剂, 能竞争性地抑制 E2 与 ERs 的结合, 通过阻断和加速 ERs 蛋白的降解, 从而有效阻断雌激素通过 ERs 的信号传导(Osborne et al., 1995), 广泛用于抑制脊椎动物雌激素的活性(Osborne et al., 2004)。MPP dihydrochloride 对 ER α 具有很强的拮抗活性, 而对 ER β 既不具有激动作用, 也没有抑制作用(Zhou et al., 2009)。Cyclofenil 是一种选择性雌激素受体调节剂, 对 ER β 的亲合力高于对 ER α 的亲合力(Seo et al., 2006)。本研究结果表明, ERs 拮抗剂 Fulvestrant、MPP dihydrochloride 和 Cyclofenil 都能有效阻碍 E2 与其受体 ERs 结合, 从而消除 E2 对 Fsh 和 Lh 的抑制作用, 其中 Fulvestrant 的作用效果最好。

综上所述, 本研究证实了E2可通过雌激素受体抑制卵形鲳鲹中 $fs\beta$ 和 $lh\beta$ 基因的表达, 从而在生殖调控中发挥着重要作用。该研究有助于增进

对神经内分泌调控的理解, 指导E2生理功能的研究, 也为鱼类或其他脊椎动物的相关研究提供了有价值的参考。

参考文献:

- 陈圣毅, 柳学周, 史宝, 等, 2014. 条石鲷促性腺激素 β (FSH, LH)亚基cDNA克隆及表达特性分析[J]. 水产学报, 38(10): 1673-1686.
- 郭萌萌, 何晨, 张诗苑, 等, 2018. 金鲳鱼不同组织脂肪酸组成比较[J]. 食品工业科技, 39(9): 45-50.
- 胡健饶, 2001. 脊椎动物促性腺激素释放激素的结构、基因表达与调控的研究进展[J]. 杭州师范学院学报(自然科学版), 5(6): 16-20.
- 李远友, 李孟孟, 汪萌, 等, 2019. 卵形鲳鲹营养需求与饲料研究进展[J]. 渔业科学进展, 40(1): 167-177.
- 李远友, 林浩然, 1998. GnRH对虎纹蛙LH和FSH分泌活动的调节作用[J]. 中山大学学报(自然科学版), 37(5): 92-96.
- 林川, 王小兵, 黄海, 2017. 卵形鲳鲹鱼种大型网箱阶梯式中间培育技术[J]. 热带生物学报, 8(4): 383-389.
- 区又君, 李加儿, 2005. 卵形鲳鲹的早期胚胎发育[J]. 中国水产科学, 12(6): 786-789.
- 夏立群, 黄郁葱, 鲁义善, 2012. 卵形鲳鲹主要病害及其研究进展[J]. 安徽农学通报, 18(23): 140-143+150.
- 杨国坤, 关佳佳, 孙彩云, 等, 2016. 抚仙金线鲃促性腺激素亚基基因克隆及组织表达分析[J]. 四川动物, 35(5): 686-690.
- 周兰, 张修月, 2005. 鱼类促性腺激素研究进展[J]. 攀枝花学院学报(综合版), 22(5): 95-100.
- 朱妍, 王文静, 夏苏东, 等, 2023. 性类固醇激素在近江牡蛎性腺发育周期的分布特征[J]. 鲁东大学学报(自然科学版), 39(2): 107-114.
- AKITO KOBAYASHI M, OUNG C HANG SOHN Y, ASUTOSHI YOSHIURA Y, et al, 2000. Effects of sex steroids on the mRNA levels of gonadotropin subunits in juvenile and ovariectomized goldfish *Carassius auratus* [J]. Fisheries Sci, 66(2): 223-231.
- ANDO H, SWANSON P, KITANI T, et al, 2004. Synergistic effects of salmon gonadotropin-releasing hormone and estradiol-17 β on gonadotropin subunit gene expression and release in Masu salmon pituitary cells *in vitro* [J]. Gen Comp Endocrinol, 137(1): 109-121.
- AROUA S, WELTZIEN F A, Le BELLE N, et al, 2007. Development of real-time RT-PCR assays for eel gonadotropins and their application to the comparison of *in vivo* and *in vitro* effects of sex steroids[J]. Gen Comp Endocrinol, 153(1/2/3): 333-343.
- AVTANSKI D, NOVAIRA H J, WU S, et al, 2014. Both estrogen receptor α and β stimulate pituitary GH gene expression[J]. Mol Endocrinol, 28(1): 40-52.
- BANERJEE A, KHAN I A, 2008. Molecular cloning of FSH and LH beta subunits and their regulation by estrogen in Atlantic croaker [J]. Gen Comp Endocrinol, 155(3): 827-837.
- BILLARD R, RICHARD M, BRETON B, 1977. Stimulation of gonadotropin secretion after castration in rainbow trout [J]. Gen Comp Endocrinol, 33(1): 163-165.
- CANDELMA M, FONTAINE R, COLELLA S, et al, 2017. Gonadotropin characterization, localization and expression in the European Hake (*Merluccius merluccius*) [J]. Reproduction, 153(2): 123-132.
- CHI M L, NI M, LI J F, et al, 2015. Molecular cloning and characterization of gonadotropin subunits (GTH α , FSH β and LH β) and their regulation by hCG and GnRH α in Japanese Sea bass (*Lateolabrax japonicus*) *in vivo* [J]. Fish Physiol Biochem, 41(3): 587-601.
- CLEVELAND B M, WEBER G M, 2016. Effects of steroid treatment on growth, nutrient partitioning, and expression of genes related to growth and nutrient metabolism in adult triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Domest Anim Endocrinol, 56: 1-12.
- DAVIS L K, VISITACION N, RILEY L G, et al, 2009. Effects of o, p'-DDE, heptachlor, and 17 β -estradiol on vitellogenin gene expression and the growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus* [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 149(4): 507-514.
- DICKEY J T, SWANSON P, 1998. Effects of sex steroids on gonadotropin (FSH and LH) regulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) [J]. J Mol Endocrinol, 21(3): 291-306.
- DOMINGUEZ G A, BISESI J H Jr, KROLL K J, et al, 2014. Control of transcriptional repression of the vitellogenin receptor gene in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) by select estrogen receptors isotypes [J]. Toxicol Sci, 141(2): 423-431.
- FONTAINE R, ROYAN M R, von KROGH K, et al, 2020.

- Direct and indirect effects of sex steroids on gonadotrope cell plasticity in the teleost fish pituitary[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11: 605068.
- GUO L, YANG J W, LIU B S, et al, 2021. Colinearity based sex-specific marker development in the golden pompano (*Trachinotus ovatus*)[J]. *Aquaculture*, 544: 737044.
- HOLLANDER-COHEN L, GOLAN M, LEVAVI-SIVAN B, 2021. Differential regulation of gonadotropins as revealed by transcriptomes of distinct LH and FSH cells of fish pituitary[J]. *Int J Mol Sci*, 22(12): 6478.
- HUGGARD-NELSON D L, NATHWANI P S, KERMOUNI A, et al, 2002. Molecular characterization of LH- β and FSH- β subunits and their regulation by estrogen in the goldfish pituitary[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 188(1/2): 171-193.
- JENG S R, YUEH W S, CHEN G R, et al, 2007. Differential expression and regulation of gonadotropins and their receptors in the Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 154(1/2/3): 161-173.
- LARSEN D A, SWANSON P, 1997. Effects of gonadectomy on plasma gonadotropins I and II in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 108(1): 152-160.
- LEVAVI-SIVAN B, BOGERD J, MAÑANÓS E L, et al, 2010. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 165(3): 412-437.
- LI G, TANG H, CHEN Y, et al, 2018. Estrogen directly stimulates LH β expression at the pituitary level during puberty in female zebrafish [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 461: 1-11.
- LIN S W, GE W, 2009. Differential regulation of gonadotropins (FSH and LH) and growth hormone (GH) by neuroendocrine, endocrine, and paracrine factors in the zebrafish—An in vitro approach [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 160(2): 183-193.
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 25(4): 402-408.
- MARLATT V L, MARTYNIUK C J, ZHANG D, et al, 2008. Auto-regulation of estrogen receptor subtypes and gene expression profiling of 17 β -estradiol action in the neuroendocrine axis of male goldfish[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 283(1/2): 38-48.
- MATEOS J, MAÑANOS E, CARRILLO M, et al, 2002. Regulation of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and sexual steroids in the Mediterranean Sea bass[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 132(1): 75-86.
- McCREERY B R, LICHT P, BARNES R, et al, 1982. Actions of agonistic and antagonistic analogs of gonadotropin releasing hormone (Gn-RH) in the bullfrog *Rana catesbeiana*[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 46(4): 511-520.
- MEIRI I, KNIBB W R, ZOHAR Y, et al, 2004. Temporal profile of beta follicle-stimulating hormone, beta luteinizing hormone, and growth hormone gene expression in the protandrous hermaphrodite, gilthead seabream, *Sparus aurata* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 137(3): 288-299.
- MENUET A, Le PAGE Y, TORRES O, et al, 2004. Analysis of the estrogen regulation of the zebrafish estrogen receptor (ER) reveals distinct effects of ER α , ER β 1 and ER β 2 [J]. *J Mol Endocrinol*, 32(3): 975-986.
- MITTELHOLZER C, ANDERSSON E, TARANGER G L, et al, 2009. Quantification of gonadotropin subunits GP α , FSH β , and LH β mRNA expression from Atlantic cod (*Gadus morhua*) throughout a reproductive cycle[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 153(3): 288-295.
- MOMMSEN T P, LAZIER C B, 1986. Stimulation of estrogen receptor accumulation by estradiol in primary cultures of salmon hepatocytes[J]. *FEBS Lett*, 195(1/2): 269-271.
- NG Y, WOLFE A, NOVAIRA H J, et al, 2009. Estrogen regulation of gene expression in GnRH neurons[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 303(1/2): 25-33.
- NYUJI M, KAZETO Y, IZUMIDA D, et al, 2016. Greater amberjack Fsh, Lh, and their receptors: Plasma and mRNA profiles during ovarian development [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 225: 224-234.
- OSBORNE C K, CORONADO-HEINSOHN E B, HILSENBECK S G, et al, 1995. Comparison of the effects of a pure steroidal antiestrogen with those of tamoxifen in a model of human breast cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 87(10): 746-750.
- OSBORNE C K, WAKELING A, NICHOLSON R I, 2004. Fulvestrant: An oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action[J]. *Br J Cancer*, 90(Suppl 1): S2-S6.
- QIN X, XIAO Y, YE C, et al, 2018. Pituitary action of E $_2$ in prepubertal grass carp: Receptor specificity and signal transduction for luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone regulation[J]. *Front Endocrinol*, 9: 308.

- REN X, HUANG Y, LI X, et al, 2022. Identification and functional characterization of gonadotropin-releasing hormone in pompano (*Trachinotus ovatus*) [J]. Gen Comp Endocrinol, 316: 113958.
- SALIGAUT C, LINARD B, MAÑANOS E L, et al, 1998. Release of pituitary gonadotrophins GtH I and GtH II in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Modulation by estradiol and catecholamines [J]. Gen Comp Endocrinol, 109(3): 302-309.
- SEO J W, COMNINOS J S, CHI D Y, et al, 2006. Fluorine-substituted cyclofenil derivatives as estrogen receptor ligands: synthesis and structure-affinity relationship study of potential positron emission tomography agents for imaging estrogen receptors in breast cancer [J]. J Med Chem, 49(8): 2496-2511.
- SHI B, LIU X, XU Y, et al, 2015. Molecular characterization of three gonadotropin subunits and their expression patterns during ovarian maturation in *Cynoglossus semilaevis* [J]. Int J Mol Sci, 16(2): 2767-2793.
- SINGH S P, WOLFE A, NG Y, et al, 2009. Impaired estrogen feedback and infertility in female mice with pituitary-specific deletion of estrogen receptor alpha (ESR1) [J]. Biol Reprod, 81(3): 488-496.
- SO W K, KWOK H F, GE W, 2005. Zebrafish gonadotropins and their receptors: II. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits--their spatial-temporal expression patterns and receptor specificity [J]. Biol Reprod, 72(6): 1382-1396.
- SUZUKI K, NAGAHAMA Y, KAWAUCHI H, 1988. Steroidogenic activities of two distinct salmon gonadotropins [J]. Gen Comp Endocrinol, 71(3): 452-458.
- WANG H, WU Y, XIANG H, et al, 2022. UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS/MS-based untargeted lipidomics reveals molecular mechanisms and metabolic pathways of lipid changes during golden pomfret (*Trachinotus ovatus*) fermentation [J]. Food Chem, 396: 133676.
- WANG Y N, LEE H H, HSU J L, et al, 2020. The impact of PD-L1 N-linked glycosylation on cancer therapy and clinical diagnosis [J]. J Biomed Sci, 27(1): 77.
- WU F, ZHANG X, ZHANG W, et al, 2009. Expression of three gonadotropin subunits in Southern catfish gonad and their possible roles during early gonadal development [J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 153(1): 44-48.
- YAMAGUCHI Y, NAGATA J, NISHIMIYA O, et al, 2021. Molecular characterization of *fshb* and *lhb* subunits and their expression profiles in captive white-edged rockfish, *Sebastes taczanowskii* [J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 261: 111055.
- YAN H, LI Q, LIU W, et al, 2011. Seasonal changes of oestradiol-17 β and testosterone concentrations in the gonad of the razor clam *Sinonovacula constricta* (Lamarck, 1818) [J]. J Molluscan Stud, 77(2): 116-122.
- ZHAO W, CUI X, WANG Z Q, et al, 2022. Effects of *Barranca yajiagensis* powder in the diet of *Trachinotus ovatus* on the growth performance, antioxidant capacity, immunity and morphology of the liver and intestine [J]. Antioxidants (Basel), 11(7): 1220.
- ZHOU H B, CARLSON K E, STOSI F, et al, 2009. Analogs of methyl-piperidinopyrazole (MPP): Antiestrogens with estrogen receptor α selective activity [J]. Bioorg Med Chem Lett, 19(1): 108-110.

(责任编辑 张冰)