

黄鳍鲷(*Sparus latus*)两种生长激素受体的 cDNA 克隆及组织表达分析*

马细兰^{1, 2, 3} 冷婷婷¹ 刘启智¹ 周立斌³ 张 勇^{1①} 林浩然¹

(1. 中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室 生命科学学院 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. 华南师范大学生命科学学院 广州 510631;
3. 惠州学院生命科学系 生物技术研究所 惠州 516007)

提要 采用 RT-PCR 方法克隆了黄鳍鲷两种生长激素受体(Growth hormone receptor, GHR)的 cDNA 序列, 序列分析表明: GHR1 开放阅读框为 1935bp, 共编码 645 个氨基酸, GHR2 开放阅读框为 1749bp, 共编码 583 个氨基酸, GHR1 与 GHR2 的氨基酸同源性为 36.7%。GHR1 和 GHR2 在分子结构上存在显著差异, GHR1 胞外域有 7 个半胱氨酸残基而 GHR2 只有 6 个; GHR1 胞内域有 9 个酪氨酸残基而 GHR2 只有 5 个, 两者的结构差异表明两者可能具有不同的生物学功能。用 Real-time RT-PCR 方法研究了 GHR1 和 GHR2 在各组织的分布情况, 结果表明: GHR1 和 GHR2 在所检测的 10 种组织中均有表达, 其中以肝脏、肌肉、垂体表达量较高, 且在大部分组织中 GHR2 表达量均高于 GHR1。

关键词 黄鳍鲷, 生长激素受体, cDNA 克隆, Real-time RT-PCR, 组织表达

中图分类号 Q95

生长激素(Growth hormone, GH)是脊椎动物脑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 不敏感(Growth hormone insensitivity, GHIS)的病人出现生长缓慢, 其原因在于它们的 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)。

国内外学者针对鱼类生长激素的相关内容做了大量研究, 而对鱼类生长激素受体的研究起步较晚, 现已克隆了黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*) (Tse *et al*, 2003)、真鲷(*Sparus aurata*) (Calduch-Giner *et al*, 2003)、日本鳗鲡(*Anguilla japonica*) (Ozaki *et al*, 2006a)等十多种鱼的 GHR, 并对 GHR 的表达模式进行了初步的研究(Tse *et al*, 2003; Ozaki *et al*, 2006b; 马细兰等, 2010)。近年来在真鲷(Saera-Vila *et al*, 2005)、黑鲷(Jiao *et al*, 2006)、南方鲳(*Silurus meridionalis*) (章力等, 2006)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) (马细兰等, 2006; Ma *et al*, 2007)、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*) (Li *et al*, 2007)等少数几种鱼中克隆到了两种类型的 GHR, 这是一个崭新的发现, 有待进一步深入研究。

* 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目, 2010CB126302 号; 广东省自然科学基金资助项目, 9451601501001986 号; 广东省教育部产学研结合项目, 2010B090400551 号。马细兰, 博士, 副教授, E-mail: mxl@hzu.edu.cn

① 通讯作者: 张 勇, 副教授, E-mail: lsszy@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2011-02-15, 收修改稿日期: 2011-04-21

黄鳍鲷(*Sparus latus*)隶属鲈形目(Percioformes)、鲷科(Sparidae),系浅海底栖、暖水性鱼类,分布于朝鲜、日本、印度尼西亚、菲律宾、印度,以及东海、南海,是我国南方沿海常见的高档经济鱼类。黄鳍鲷食性杂、适应性广、肉质细嫩鲜美、质优价高,是近海资源增殖及人工养殖的优良品种。迄今为止尚未见有关黄鳍鲷生长激素受体的研究报道。

本文采用 RT-PCR 方法克隆了黄鳍鲷两种 GHR 编码 cDNA,应用 Real-time PCR 方法比较分析了两种 GHR 基因的组织表达,拟为鱼类生长调节提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼 黄鳍鲷(*Sparus latus*)采自广东省电白县科兴鱼虾养殖场,克隆基因和组织分布的实验用鱼均为 18 月龄成鱼,体长为 (15.5 ± 2.5) cm,体重为 (136.5 ± 43.9) g。组织取出后放入经 DEPC 处理的 1.5ml 塑料离心管,并立即置于液氮,带回实验室保存在 -80°C 超低温冰箱。

1.1.2 试剂 总 RNA 提取试剂 Trizol Reagent、DNase I 试剂盒购自 Invitrogen 公司,ReverTra Ace- α -TM SYBR Green I Real-time RT-PCR 试剂盒购自 TOYOBO 公司,Ex TaqTM 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 以黄鳍鲷肝脏组织为材料,提取 RNA,经 DNase I 处理后,按 ReverTra Ace- α -TM RT-PCR 试剂盒说明书合成第一链。在黑鲷(GHR1 AF502071; GHR2 AY662334)和金头鲷(GHR1 AF438176; GHR2 AY573601)GHR 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(GHR1-F1 与 GHR1-R1, GHR2-F1 与 GHR2-R1)扩增 GHR cDNA 编码区。PCR 反应程序为: 94°C 预变性 3min, 然后 94°C 变性 30s, 55°C 退火 30s, 72°C 延伸 2min, 35 个循环后 72°C 延伸 15min。将所获得的 PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上 100V 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,与 GenBank 中其它物种的 GHR 序列进行相似性比较。

1.2.2 黄鳍鲷 GHR 的组织表达分析 选取垂体、鳃、心脏、肝脏、脾脏、肾脏、胃、肠、肌肉、性腺 10 种组织进行检测。用 Trizol 提取各组织的总 RNA,通过 DNase I 处理后,采用 ReverTra Ace- α -TM First Strand cDNA Synthesis Kit (TOYOBO, Japan)进行反转录。采用真鲷 β -actin 基因(No.AY362763)作为内参基因,校正各基因的反转录效率。同时设计各基因的特异性引物,引物选用见表 1。

表 1 克隆黄鳍鲷 GHRs cDNA 序列及检测 mRNA 表达所用引物

Tab.1 Primers used for cloning and expression analysis of *S. latus* GHRs

引物	序列	引物
GHR1-F1	5'-GCCATCAGATGACCAAGTTGTG-3'	克隆引物
GHR1-R1	5'-GCGACTTCCTGGTCAATCAGC-3'	克隆引物
GHR1-F2	5'-TCAGCGACTCCGTCTTCA-3'	表达引物
GHR1-R2	5'-TGGCTCGTCTTGGTAGAAATCC-3'	表达引物
GHR2-F1	5'-GCTCGACACCATGGCTGCCAC-3'	克隆引物
GHR2-R1	5'-TTCGCTGCTGATCTATGGTGTG-3'	克隆引物
GHR2-F2	5'-CTCATCCCAAATCAAACCC-3'	表达引物
GHR2-R2	5'-CCACCTCGGTCTGTCTCT-3'	表达引物
β -actinF1	5'-ACCCAGATCATGTTTCGAGACC-3'	表达引物
β -actinR1	5'-ATGAGGTAGTCTGTGAGGTCG-3'	表达引物

Real-time PCR 反应体系采用 20 μl 体系: 10 μl SYBR Green Real-time PCR Master Mix (TOYOBO, Japan), 1 μl RT 产物, 0.4 μl 的特异性引物。PCR 反应程序: 95°C 预变性 60s, 然后 95°C 变性 15s, 65°C 退火 15s, 72°C 延伸 23s, 40 个循环。

通过 ABI PRISM 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems)测定各基因的阈值循环数(threshold cycle, C_T)。通过质粒浓度梯度和所对应的 C_T 值建立 β -actin、GHR1、GHR2 基因的标准曲线。然后通过各样品所对应的 C_T 值和标准曲线计算出各待测样品的浓度。结果采用相对浓度表示,即表示为目的基因浓度/内参基因浓度($\text{GHR}/\beta\text{-actin} \times 100$)。

1.2.3 数据分析 用平均值 $\pm$ 标准差表示黄鳍鲷

量最高, 显著高于其它各组织 ($P < 0.05$)。除肝脏外, GHR1 在肌肉和肠组织的表达要显著高于其余 7 种组织; GHR2 则在肌肉和垂体组织中的表达要显著高于其余 7 种组织 ($P < 0.05$)。

比较同一组织中 GHR1 与 GHR2 的表达情况发现, 正常生理状态下, 大部分组织 GHR2 的表达显著高于 GHR1 ($P < 0.05$), 如垂体、心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肌肉和性腺组织 (图 6)。

3 讨论

从黄鳍鲷肝脏中克隆到生长激素受体 I 型 (GHR1) 和 II 型 (GHR2) 均具有脊椎动物 GHR 的一般特性。GHR1、GHR2 的胞外区在靠近跨膜区的位置都有一个保守的 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。GHR1 的胞外区有 7 个保守的半胱氨酸, 其中 6 个可形成 3 个二硫键 (C59 与 C69, C102 与 C112, C126 与 C133), 而 GHR2 只有 5 个保守的 C, 只能形成 2 个二硫键 (C38 与 C48、C83 与 C94)。二硫键起着维持 GHR 胞外区段特定空间结构的作用。GHR2 比 GHR1 少 1 个二硫键, 可以推测 GHR2 的膜外结构不如 GHR1 的稳定, 更具流动性, 这可能会影响其与配体 GH 的结合。GHR1、GHR2 胞内区都有两个保守的 Box: Box1 富含脯氨酸



图 4 黄鳍鲷两种生长激素受体氨基酸序列的比对

Fig.4 Alignment of the deduced amino acids sequence of *S. latipes* GHR1 and GHR2
注: 点点下划线: FGEFS 基序; 斜体: 跨膜区; 方框: box1、box2 保守区; 阴影: 胞外区半胱氨酸和胞内区酪氨酸

(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)。胞内域的酪氨酸

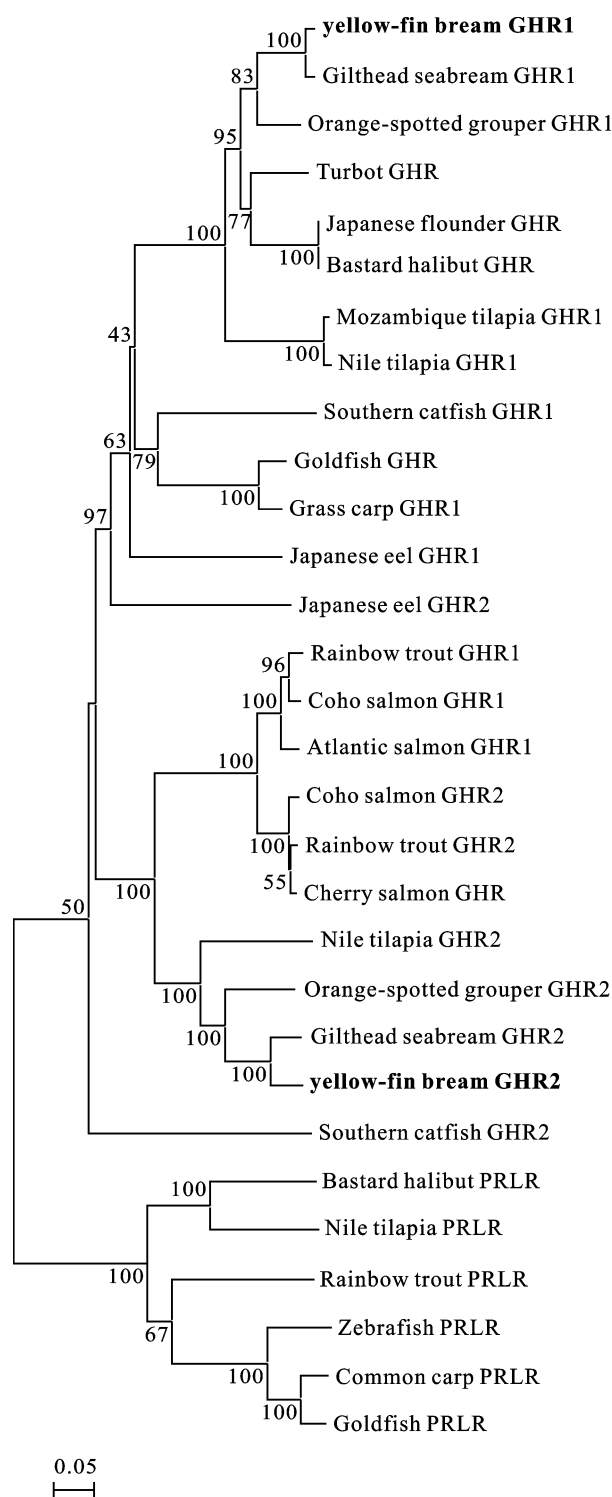


图5 鱼类 GHR 进化系统树

Fig.5 Phylogenetic tree of fish GHRs

注: 本进化树采用 MEGA 3.1 软件构建。由软件 Clustal X 1.8 生成, 图形显示采用软件 Tree View 1.6.6, 图中数值表示置信度

酸残基, GHR1 有 9 个而 GHR2 只有 6 个, 缺少了 Y1、Y3、Y6。有学者认为 GHR 的胞内酪氨酸的磷酸化作

用可为分子信号传导提供停靠位点(docker sites)(Wang *et al*, 1996)。因此, GHR2 胞内酪氨酸数目的减少可能同样会影响配体 GH 与 GHR 的结合。日本鳎 GHR 的配体-受体结合实验表明: 日本鳎 GH 只与 GHR1 特异结合而与 GHR2 无特异结合(Ozaki *et al*, 2006b)。GH 对黑鲷 GHR1 和 GHR2 的启动子的表达有不同的影响作用, GH 可刺激表达 GHR1 的中国仓鼠卵巢细胞(CHO 细胞)的 Spi 2.1 启动子、 β -casein 启动子和 c-fos 启动子的表达, 但只刺激表达 GHR2 的 CHO 细胞的 Spi 2.1 启动子和 β -casein 启动子, 而不能刺激 c-fos 启动子的表达(Jiao *et al*, 2006)。这些结果都表明 GHR1 和 GHR2 与 GH 有不同的结合效果, 进一步说明 GHR1 与 GHR2 可能具有不同的生物学功能。

GHR2 是鱼类特有的基因, 目前只在少数鱼类如黑鲷、金头鲷、南方鲶、斜带石斑鱼、尼罗罗非鱼、黄鳍鲷等中克隆得到, GHR2 与传统的 GHR 有一定的结构差异, 它们与鲑科鱼类的 GHR 相似。这几种鱼类的 GHR2 的同源性都很高, 大于 70%, 种间的同源性基本反映亲缘关系, 即种间关系越近同源性越高。

用荧光定量 PCR 方法比较了黄鳍鲷的两种 GHR 在 10 种组织中的表达差异, 结果表明, 两种 GHR 在 10 种组织中均有表达。黄鳍鲷 GHR 在多种组织中都表达支持了鱼类 GH 具有多种生理功能的观点。黑鲷、尼罗罗非鱼、斜带石斑鱼三种鲈形目鱼类 GHR 的表达模式相似, 在多数组织中 GHR2 的表达显著高于 GHR1(Jiao *et al*, 2006; Ma *et al*, 2007; Li *et al*, 2007), 黄鳍鲷 GHR 的表达模式也与之相似。在黄鳍鲷多数组织中 GHR2 的表达显著高于 GHR1, 说明 GHR 的 mRNA 表达有明显的组织特异性和类型特异性。Særa-Vila 等(2005)比较分析了真鲷两种 GHR 表达的组织特异性, 结果显示, GHR2 在肝脏和脂肪中的表达明显低于 GHR1, 在骨骼肌中两者的表达无显著差异, 这与黑鲷、尼罗罗非鱼、斜带石斑鱼、黄鳍鲷研究结果不一致, 说明鱼类 GHR 基因组织表达模式有组织的特异性。鱼类 GHR 组织表达的特异性可能与鱼的不同生理状态有关, 饱食或饥饿都会影响鱼类 GHR 的表达(Deng *et al*, 2004), 不同的采样时间(不同季节或不同发育时期)也可能影响鱼类 GHR 的表达(Wargelius *et al*, 2005)。GHR 的表达存在组织和组织的特异性, 暗示这两种 GHR 可能有不同的生理功能。

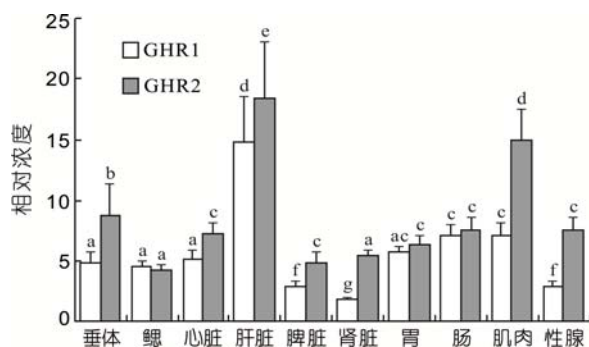


图 6 黄鳍鲷 GHRs 基因在 10 种组织中的表达特异性

Fig.6 Relative expression of GHRs mRNA in 10 tissues of *S. latus*

注: 数据表示为平均值±标准差($n=3$), 不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)

参 考 文 献

- 马细兰, 张 勇, 刘晓春等, 2010. 半胱胺盐酸盐(CSH)对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)生长及生长轴相关基因表达的影响. 海洋与湖泊, 41(2): 240—245
- 马细兰, 张 勇, 黄卫人等, 2006. 尼罗罗非鱼生长激素及其受体的 cDNA 克隆与 mRNA 表达的雌雄差异分析. 动物学报, 52(5): 924—933
- 林浩然, 1999. 鱼类生理学. 广州: 广东高等教育出版社, 210—212
- 章 力, 黄希贵, 焦保卫等, 2006. 南方鲷两种生长激素受体的结构分析及其组织分布和激素调节. 动物学报, 52(6): 1096—1106
- Calduch-Giner J A, Mingarro M, Vega-Rubin de Celis S *et al*, 2003. Molecular cloning and characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone receptor (GHR). Assessment of alternative splicing. Comp Biochem Physiol (Part B), 136: 1—13
- Deng L, Zhang W M, Lin H R *et al*, 2004. Effects of food deprivation on expression of growth hormone receptor and proximate composition in liver of black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*). Comp Biochem Physiol (Part B), 137: 421—432
- Dinerstein H, Lago F, Goujon L *et al*, 1995. The praline-rich region of the GH receptor is essential for JAK2 phosphorylation, activation of cell proliferation, and gene transcription. Mol Endocrinol, 9: 1701—1707
- Govers R, ten Broeke T, van Kerkhof P *et al*, 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
- Jiao B W, Huang X G, Chan C B *et al*, 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 sea bream. J Mol Endocrinol, 36(1): 23—40
- Li Y, Liu X C, Zhang Y *et al*, 2007. Molecular cloning, characterization and distribution of two types of growth hormone receptor in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). Gen Comp Endocrinol, 152(1): 111—122
- Ma X, Liu X C, Zhang Y *et al*, 2007. Two growth hormone receptors in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): molecular characterization, tissue distribution and expression profiles during different gonad developing stages. Comp Biochem Physiol (Part B), 147(2): 325—339
- Ozaki Y, Fukada H, Kazeto Y *et al*, 2006a. 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
- Ozaki Y, Fukada H, Tanaka H *et al*, 2006b. Expression of growth hormone family and growth hormone receptor during early development in the Japanese eel (*Anguilla japonica*). Comp Biochem Physiol, 145(1): 27—34
- Ross Richard J M, 1999. The GH receptor and GH insensitivity. Growth Hormone & IGF Research, 9(Suppl.), B: 42—46
- 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 gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Gen Comp Endocrinol, 142: 193—203
- Tanaka M, Hayashida Y, Wakita M *et al*, 1995. Expression of aberrantly spliced growth hormone receptor mRNA in the sex-linked dwarf chicken, Gifu 20. Growth Regulation, 5: 218—223
- Tse D L, Tse M C, Chan C B *et al*, 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, 1625: 64—76
- Wang X, Darus C J, Xu B C *et al*, 1996. Identification of growth hormone receptor (GHR) tyrosine residues required for GHR phosphorylation and JAK2 and STAT5 activation. Mol Endocrinol, 10(10): 1249—1260
- Wargelius A, Fjellidal P G, Benedet S *et al*, 2005. A peak in GH-receptor expression is associated with growth activation in Atlantic salmon vertebrae, while upregulation of igf-I receptor expression is related to increased bone density. Gen Comp Endocrinol, 142: 163—168

cDNAs CLONING AND TISSUES EXPRESSION OF TWO GROWTH HORMONE RECEPTORS IN YELLOW-FIN BREAM *SPARUS LATUS*

MA Xi-Lan^{1,2,3}, LENG Ting-Ting¹, LIU Qi-Zhi¹, ZHOU Li-Bin³,
ZHANG Yong¹, LIN Hao-Ran¹

(1. State Key Laboratory of Biocontrol, Institute of Aquatic Economic Animals and Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic Animals, School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, 510275; 2. School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou, 510631; 3. Department of Life Science, Institute of Biotechnology, Huizhou University, Huizhou, 516007)

Abstract Growth hormone (GH) has many important physiological roles in the control of growth, metabolism and reproduction, which is mediated by growth hormone receptor (GHR). In this study, two cDNAs encoding GHR were isolated from the liver of yellow-fin bream *Sparus latus*. The two cDNAs, one consisting of 1935bp and the other of 1749bp, encoding for putative 645- and 583-amino acid GHR (designated GHR1 and GHR2, respectively), shared 36.7% identity in deduced amino acid sequence. GHR1 and GHR2 showed the conserved structural characteristics of GHR family, including the FGEFS motif, the box1 and box2 regions, extracellular cysteine residues and intracellular tyrosine residues. However, there were differences of structural features between the two receptors as well. GHR2 lacked one pair of extracellular cysteines and 4 intracellular tyrosine residues which were conservative in GHR1. The structural discrepancies thus undoubtedly indicated the distinct biological functions of GHR1 and GHR2. Real-time RT-PCR analysis showed that both GHR1 and GHR2 mRNAs were presented in all tissues tested and expressed extremely highly in the liver. In most tissues, GHR2 expressed significantly higher than GHR1. The expression distinction of GHR1 and GHR2 in pituitary and peripheral tissues like liver, muscle, spleen, kidney and gonad indicated that the two receptors may have different biological functions.

Key words Yellow-fin bream *Sparus latus*, Growth hormone receptor, cDNA clone, Real-time PCR, Tissue expression

2011 年度《海洋与湖沼》动态

(1) 《海洋与湖沼》2011 年最新公布的总被引频次在海洋科学期刊中名列第一位; 影响因子为 1.404, 学科影响指标和综合评价总分均列海洋科学期刊首位; 综合评价总分在全国期刊中排第 18 位。

(2) 荣获 2011 年度百种中国杰出期刊奖。

(3) 荣获 2011 年度中国精品期刊奖。