

# 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\*

马细兰<sup>1,2</sup> 张勇<sup>1</sup> 刘晓春<sup>1</sup> 周立斌<sup>2</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 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. 惠州学院生命科学系 生物技术研究所 惠州 516007)

**提要** 为了分析半胱胺盐酸盐(CSH)对尼罗罗非鱼生长调节的作用,设计了长期和短期 2 个实验,采用腹腔注射(剂量 100 $\mu$ g/g 体重)方法,分析 CSH 对尼罗罗非鱼绝对生长率、特定生长率、肝体系数和肥满度的影响,并应用荧光实时定量 PCR 方法检测在注射 CSH 后不同时段(6h, 12h, 24h, 2 周)尼罗罗非鱼垂体 GH、肝脏 GHR 和肝脏 IGF-I 基因的表达变化。结果表明,CSH 组尼罗罗非鱼的绝对生长率、特定生长率、肝体系数、肥满度均显著高于对照组( $P < 0.05$ );注射 CSH 后 12h、24h 垂体 GH 和肝脏 GHR mRNA 表达水平均显著升高( $P < 0.05$ ),2 周后恢复到对照组水平;注射 CSH 后 6h 肝脏 IGF-I mRNA 表达水平显著升高( $P < 0.05$ ),12h 恢复到对照组水平,24h 和 2 周表达水平极显著上升( $P < 0.01$ )。以上结果提示,CSH 可显著上调尼罗罗非鱼生长轴相关基因的表达,从而促进鱼类的生长。

**关键词** 尼罗罗非鱼, 半胱胺盐酸盐(CSH), 生长, 基因表达

**中图分类号** S966.12

鱼类生长的神经内分泌调控机制与哺乳类动物相似,下丘脑—垂体—肝脏轴构成调控生长的中心环节,生长激素(Growth hormone, GH)处在生长轴的中心位置,体内 GH 主要受下丘脑生长激素释放激素(Growth hormone-releasing hormone, GHRH)的促进和生长抑素(Somatostatin, SS)的抑制(林浩然, 1999)。诸多神经内分泌因子通过增强 GHRH 或削弱 SS, 升高 GH 水平, 进而促进鱼类生长(林浩然, 2000)。半胱胺(Cysteamine, CS)是半胱氨酸代谢的中间产物,为辅酶 A 的组成成分之一。半胱胺盐酸盐(Cysteamine hydrochloride, CSH)是 CS 化学性质较稳定的衍生物,被用作 CS 的替代品(刘均利, 1990)。对哺乳类的研究表明,CSH 是 SS 的消竭剂,它通过降低 SS 的 mRNA 水平来抑制 SS 的合成(Papchristou *et al.*, 1994),且 CSH 中的巯基和氨基等活性基团可破坏 SS 多肽结构中的二硫键,改变 SS 的分子构型(Szabo *et al.*, 1981),

使大鼠脑内 SS 的免疫性和生物活性快速下降(Kwok *et al.*, 1992),解除对 GH 的抑制作用。已有研究表明,口服适量半胱胺盐酸盐能提高 GH 水平,促进猪(丁宏标等, 1994)、家禽(金光明等, 2006; 闻爱友等, 2005)、兔和奶牛(高腾云等, 2001)、绵羊(贾斌等, 2003)等动物的生长,提高蛋(禽)、奶(牛)产量。但 CS 是否能影响鱼类 SS 水平,促进鱼类的生长,在实际养殖业中的应用报道较少(Xiao *et al.*, 2003; 石和荣等, 2005a, b)。

本文以尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)为研究对象,通过腹腔注射方法分析了 CSH 的促生长作用,并应用 real-time PCR 方法检测了 CSH 对尼罗罗非鱼生长轴相关基因(垂体 GH, 肝脏 GHR 和肝脏 IGF-I)表达的影响,旨在探讨 CSH 的促生长作用机制,为水产养殖提供理论依据。

目前,荧光实时定量 PCR(real-time quantitative

\* 广东省海洋渔业科技推广专项项目, A200901C03 号; 广东省科技计划项目, 2004A20105001 号; 珠海市科技计划项目, PC20051054 号。马细兰, 博士, E-mail: mxl@hzu.edu.cn; 412836174@qq.com

通讯作者: 林浩然, 中国工程院院士, E-mail: lsslhr@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2009-09-12, 收修改稿日期: 2009-10-21

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。本试验建立了荧光实时定量 PCR 的标准品质粒和标准曲线, 以此来对黑鲟 ghrelin 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 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验鱼的来源、驯化及实验设计** 尼罗罗非鱼采自广东省番禺国家级罗非鱼良种场, 在实验前 1 周选取体长、体重相近的尼罗罗非鱼, 经消毒处理后放入体积为 4m×2m×1.2m 的水泥池中暂养, 暂养期间, 每天固定时间投喂(2 次), 上午 9:00—10:00, 下午 16:00—17:00, 每次投喂量约为体重的 2%。

试验地点在广东省番禺国家级罗非鱼良种场, 长期注射实验的时间为 2005 年 7—10 月, 水温(32±4) °C, pH 值 6.7—7.3, 溶氧值大于 6mg/L, 氨态氮小于 2mg/L; 短期注射实验的时间为 2006 年 3 月, 水温(24±3) °C。

**1.1.2 试剂与药品** 鱼用生理盐水(PS)为实验室自配; 半胱胺盐酸盐(Cysteamine hydrochloride, CSH), 由华扩达(Walcom, Shanghai, China)公司赠送。

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。

**1.1.3 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。

### 1.2 方法

**1.2.1 长期实验** 选用 200 尾性未成熟的尼罗罗非鱼[体长(12.0±0.7)cm; 体重(53.0±8.4)g] 随机分成 2 组, 饲养在 2 个水泥池(4m×2m×1.2m)中。腹腔注射 0.5μl PS 或 CSH(CSH 溶于 PS, 剂量为 100μg/g 体重)。隔周注射, 共注射 4 次, 实验共持续 10 周, 设开始注射 CSH 当天为“day 0”, 分别在 day 14、28、42、56、70 取样, 通过性腺观察判断鱼的性别。测量实验鱼基本的生物学数据, 包括体长、体重和肝重, 用以计算实验鱼的绝对生长率(Absolute Growth Rate, AGR)、特定生长率(Special Growth Rates, SGR)、肥满度(Condition Factor, CF)和肝体系数(Hepatosomatic Index, HIS)。取垂体组织测 GH mRNA 水平, 取肝脏组织测 GHR 和 IGF-I mRNA 水平。

计算公式:

$$\text{肥满度 } CF(\%) = 100 \times \text{体重}(\text{g}) / \text{体长}(\text{cm})^3 \quad (1)$$

$$\text{肝体系数 } HIS(\%) = 100 \times \text{肝重} / \text{体重} \quad (2)$$

$$\text{体长绝对生长率 } ARG_L(\%) = 100 \times (L_2 - L_1) / L_1 \quad (3)$$

$$\text{体重绝对生长率 } AGR_W(\%) = 100 \times (W_2 - W_1) / W_1 \quad (4)$$

$$\text{体长特定生长率 } SGR_L(\%/d) = 100 \times [(\ln L_2 - \ln L_1)] / (\Delta T) \quad (5)$$

$$\text{体重特定生长率 } SGR_W(\%/d) = 100 \times [(\ln W_2 - \ln W_1)] / (\Delta T) \quad (6)$$

$$\text{实验组 } SGR_W \text{ 的提高率}(\%) = 100 \times$$

(实验组  $SGR_W$  - 对照组  $SGR_W$ ) / 对照组  $SGR_W$  (7)  
式中,  $L_1$  为  $T_1$  时体长,  $L_2$  为  $T_2$  时体长,  $W_1$  为  $T_1$  时体重,  $W_2$  为  $T_2$  时体重,  $\Delta T = T_2 - T_1$ 。

**1.2.2 短期实验** 选用 120 尾性未成熟的尼罗罗非鱼[体长(13.9±0.7)cm; 体重(72.1±11.4)g]随机分成 2 组, 腹腔注射 0.5μl PS 或 CSH(CSH 溶于 PS 中, 剂量为 100μg/g 体重)。每组鱼又随机分养在 3 个水簇箱(100cm×40cm×50cm)中, 分别在注射后的第 6h、12h、24h 采样, 取性腺观察判断鱼的性别, 取垂体组织测 GH mRNA 水平和肝脏组织测 GHR、IGF-I mRNA 水平。

### 1.2.3 生长轴基因 mRNA 表达的分析

(1) 总 RNA 提取 将在 -80 °C 超低温冰箱中冻存的组织取出, 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  $OD_{260}$  值计算 RNA 的浓度, 以  $OD_{260}/OD_{280}$  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 °C 保存备用。

(2) 反转录(RT)合成 cDNA RT 的反应体积为 20μl, 样品 RNA 2μl, 2.5mmol/L dNTP 2μl, oligo(dT)<sub>18</sub>

(16pmol/L) 2 $\mu$ l、5 $\times$ 逆转录缓冲液 4 $\mu$ l、AMV 反转录酶 1 $\mu$ l (5U)、RNasin 1 $\mu$ l (40U), 补充 DEPC 处理过的水至体积 20 $\mu$ l。上述成分混匀后于 PCR 仪器中, 42 45min, 99 5min 灭活 AMV 酶。

(3) 引物设计 参照 GenBank 中尼罗罗非鱼  $\beta$ -actin (AY116536)、GH (M26916)、GHR (EF052861)、IGF-I (AY919869), 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  
Tab.1 Primers used for real-time quantitative PCR analysis

引物	序列
$\beta$ -actin-F	5'-GGTGGGTATGGGTCAGAAAGA-3'
$\beta$ -actin-R	5'-GCTGTCGTGAAGGAGTAG-3'
GH-F	5'-ATTATCAAAGTCTGGGAGGC-3'
GH-R	5'-GGTAGGTCTCCACCTGTGC-3'
GHR-F	5'-TAAGAAAGAGCCTCTACCA-3'
GHR-R	3'-ACTGTCGCTGAATGTCCAAT-5'
IGF-I-F	5'-TCTGTGGAGAGCGAGGCTTT-3'
IGF-I-R	5'-CACGTGACCGCCTTGCA-3'

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

(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 pGEM R-T 载体在 T4 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 DH5 $\alpha$ 感受态细胞, 涂于 Amp、X-Gal 和 IPTG 处理的 LB 琼脂平板上, 37 过夜培养, 挑取单个白色菌落, 在 Amp+/LB 液体培养基中 37、200r/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) 和测序鉴定。

(6) 重组质粒定量标准曲线的建立 测定阳性重组质粒的 OD 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 $\mu$ l, Mix 10 $\mu$ l、上下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 0.4 $\mu$ l、重组质粒 DNA

1 $\mu$ l、荧光染料 SYBRGreen 0.04 $\mu$ l、灭菌双蒸水 8.2 $\mu$ l。Real-time quantitative PCR 反应程序为: 95 预变性 60s; 95 变性 15s、55 退火 15s、72 延伸 30s, 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—95, 每 0.2 读板 1 次) 步骤。

(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 GH、GHR1、GHR2、IGF-I 基因 cDNA 进行定量。反应体系及程序同 1.2.3.6。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。

(8) 数据分析 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。

## 2 结果

### 2.1 CSH 对尼罗罗非鱼生长的影响

由表 2 可见, 腹腔注射 CSH 可显著促进尼罗罗非鱼生长。注射 CSH 2 周后, 雄鱼体重比对照组有显著提高 ( $P < 0.05$ ); 6 周后雄鱼和雌鱼体重均显著高于对照组, 且雌鱼体长比对照组也有明显提高 ( $P < 0.05$ ); 10 周后雄鱼和雌鱼体长、体重都显著提高 ( $P < 0.05$ )。与对照组相比, CSH 组的  $AGR_w$  和  $AGR_L$  都显著提高, 雌鱼和雄鱼  $AGR_w$  分别提高了 21.48% 和 26.48%,  $AGR_L$  分别提高了 28.90% 和 10.58%, 表明 CSH 对尼罗罗非鱼促生长作用明显。CSH 对尼罗罗非鱼在不同发育阶段的促生长效果存在差异, 在 0—2、2—6、6—10 周, CSH 组雄鱼的  $SGR_w$  分别比对照组提高了 25.54%、1.83%、49.94%, 雌鱼分别提高了 25.10%、10.82%、1.77%; 0—2 周 CSH 对雌鱼和雄鱼的促生长作用不存在显著差异 ( $P > 0.05$ ), 2—6 周 CSH 对雌鱼的促生长作用显著强于对雄鱼 ( $P < 0.05$ ), 6—10 周 CSH 对雄鱼的促生长作用极显著高于对雌鱼 ( $P < 0.01$ )。

另外, CSH 显著提高了尼罗罗非鱼的肥满度 ( $CF$ ) 和肝体系数 ( $HSI$ ) ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 CSH 对雄鱼 GH、GHR、IGF-I mRNA 表达的影响

对生长参数的影响分析中可以看出, CSH 可明显促进尼罗罗非鱼雄鱼和雌鱼的生长, 表明 CSH 对雄鱼和对雌鱼生长轴相关基因表达的影响一致, 为了节省工作量, 本章只研究了 CSH 对雄鱼生长轴相关基因 (垂体 GH, 肝脏 GHR, 肝脏 IGF-I) 表达的影响。

表 2 CSH 对尼罗罗非鱼生长的影响  
Tab.2 Effects of CSH on the growth of *O. niloticus*

组 别	PS		CSH		
	雌性	雄性	雌性	雄性	
初始体长(cm)	11.60±0.57 <sup>a</sup>	12.14±0.69 <sup>b</sup>	11.60±0.57 <sup>a</sup>	12.14±0.69 <sup>b</sup>	
初始体重(g)	50.50±5.41 <sup>a</sup>	54.77±6.36 <sup>b</sup>	50.50±5.41 <sup>a</sup>	54.77±6.36 <sup>b</sup>	
第 2 周	体长(cm)	13.81±0.21 <sup>a</sup>	14.52±0.57 <sup>b</sup>	14.02±0.70 <sup>a</sup>	14.74±0.42 <sup>b</sup>
	体重(g)	60.81±14.28 <sup>a</sup>	77.2±14.99 <sup>b</sup>	63.56±8.10 <sup>a</sup>	84.73±13.17 <sup>c</sup>
第 6 周	体长(cm)	16.6±0.57 <sup>a</sup>	18.84±0.66 <sup>bc</sup>	17.94±0.10 <sup>b</sup>	19.12±0.54 <sup>c</sup>
	体重(g)	149.85±3.32 <sup>a</sup>	245.68±13.80 <sup>c</sup>	172.24±8.41 <sup>b</sup>	273.35±18.89 <sup>d</sup>
第 10 周	体长(cm)	18.51±0.35 <sup>a</sup>	21.02±0.96 <sup>b</sup>	20.53±0.41 <sup>b</sup>	21.94±0.88 <sup>c</sup>
	体重(g)	199.65±32.37 <sup>a</sup>	293.35±59.16 <sup>c</sup>	230.78±26.20 <sup>b</sup>	357.56±87.01 <sup>d</sup>
第 10 周 HSI (%)	1.70±0.18 <sup>a</sup>	2.00±0.65 <sup>a</sup>	2.58±0.57 <sup>b</sup>	3.03±0.97 <sup>c</sup>	
第 10 周 CF (%)	2.47±1.02 <sup>a</sup>	3.08±1.25 <sup>b</sup>	2.96±0.78 <sup>b</sup>	3.61±0.89 <sup>c</sup>	
0—10 周 AGR <sub>L</sub> (%)	9.86	12.66	12.71	14.00	
0—10 周 AGR <sub>w</sub> (%)	212.14	340.33	257.71	431.76	
0—2 周 SGR <sub>L</sub> (%)	1.24	1.27	1.34	1.37	
0—2 周 SGR <sub>w</sub> (%)	1.33	2.43	1.66	3.05	
2—6 周 SGR <sub>L</sub> (%)	0.66	0.93	0.88	0.94	
2—6 周 SGR <sub>w</sub> (%)	3.20	4.13	3.55	4.21	
6—10 周 SGR <sub>L</sub> (%)	0.39	0.40	0.48	0.50	
6—10 周 SGR <sub>w</sub> (%)	1.03	0.64	1.05	0.96	

注：同一行中标有不同上标字母表示差异显著( $P<0.05$ )

**2.2.1 对垂体 GH mRNA 表达的影响** 注射 CSH 12h 后, 雄鱼垂体 GH mRNA 水平显著提高( $P<0.05$ ), 24h 后极显著提高( $P<0.01$ ); 隔周多次注射 CSH, 2 周后采样, 雄鱼垂体 GH mRNA 表达水平与对照组无显著差异( $P>0.05$ )(表 3)。

**2.2.2 对肝脏 GHR mRNA 表达的影响** 注射 CSH 12h 后, 雄鱼肝脏 GHR mRNA 的表达水平明显提高( $P<0.05$ ), 且这种促进作用可一直持续到 24h, 隔周多次注射 CSH, 2 周后采样, 雄鱼肝脏 GHR mRNA 的表达极显著高于对照组( $P<0.01$ )(表 3)。

**2.2.3 对肝脏 IGF-I mRNA 表达的影响** 注射 CSH 对雄鱼肝脏 IGF-I mRNA 表达的影响快速而短暂。注射 CSH 6h 后, 雄鱼肝脏 IGF-I mRNA 表达水

平显著下降( $P<0.05$ ), 12h 后恢复到对照组水平, 24h 后显著提高( $P<0.05$ ); 隔周多次注射 CSH 后 2 周采样, CSH 组雄鱼肝脏 IGF-I mRNA 水平与对照组无显著差异( $P>0.05$ )(表 3)。

### 3 讨论

对哺乳动物的研究表明, 动物对 CSH 的反应存在明显差异, CSH 的作用与施用剂量直接相关。本文所选取的注射剂量为 100 $\mu$ g/g 体重, 这是作者在做 CSH 梯度预实验时得出的最佳促生长剂量(相关数据略)。Xiao 等(2003)对草鱼的研究表明, CSH 经腹腔注射或口服均可使草鱼血清中的 GH 水平上升。本文的研究结果表明, CSH 经腹腔注射可显著促进尼罗

表 3 CSH 对尼罗罗非鱼生长轴相关基因表达的影响  
Tab.3 Effects of CSH on genes expressions of the growth axis in *O. niloticus*

基因	PS	CSH			
		6h	12h	24h	2 week
GH	100.00±18.56 <sup>a</sup>	118.77±32.34 <sup>a</sup>	195.83±68.03 <sup>b</sup>	502.11±110.21 <sup>c</sup>	152.62±53.77 <sup>ab</sup>
GHR	100.00±19.43 <sup>a</sup>	89.92±22.67 <sup>a</sup>	141.93±36.11 <sup>b</sup>	146.81±20.74 <sup>b</sup>	241.98±38.53 <sup>c</sup>
IGF-I	100.00±15.35 <sup>a</sup>	61.82±12.18 <sup>b</sup>	90.00±15.58 <sup>a</sup>	166.41±60.45 <sup>c</sup>	102.85±30.76 <sup>a</sup>

注：同一行中标有不同上标字母表示差异显著( $P<0.05$ )

罗非鱼的生长并明显上调尼罗罗非鱼生长轴相关基因的 mRNA 表达。

研究表明,生长抑素(SS)是鱼类最主要的抑制 GH 释放的神经肽类,SS 抑制 GH、IGFs 等的分泌,在外周还抑制胃酸及胰酶、胃蛋白分泌,抑制营养物质的吸收等,综合作用表现为机体的代谢机能下降,进而抑制动物生长(刘均利,1990)。半胱胺(CS)具有促进动物生长的作用,主要是通过降低或消除体内 SS 水平来实现的。在体内 CS 与 SS 分子直接作用,其活性基团(-NH<sub>2</sub>与相邻的游离-SH)对 SS 进行化学修饰,导致 SS 失去生物活性(Szabo *et al*, 1981)。本文结果表明,CSH 经腹腔注射能显著地促进尼罗罗非鱼生长,这与在去势仔猪、牛、肉鸡上的试验结果一致(丁宏标等,1994;高腾云等,2001;金光明等,2006),也与在草鱼(Xiao *et al*, 2003)、黄鳍鲷(石和荣等,2005b)上的试验结果一致。研究证实,SS 的结构在各种动物中基本相似,无种属特异性,故利用 CS 降低 SS 水平,对畜禽及水生动物同样起到促生长作用。此外,CS 在体内还通过抑制多巴胺(DA)向去甲肾上腺素的转化,导致 DA 含量升高,促进下丘脑合成和分泌 GH,进而促进动物生长(Yunker *et al*, 2004)。在淡水鱼类,注射或在饲料中拌喂 CSH 均能显著提高草鱼血清 GH 水平,CSH 对草鱼下丘脑-脑垂体组织共孵育能提高基础 GH 分泌(Xiao *et al*, 2003);CSH 能显著提高海水鱼类斜带石斑鱼脑垂体 GH 分泌水平(冉雪琴等,2004);投喂 CSH 能显著促进黄鳍鲷脑垂体 GH 水平(石和荣等,2005a),进而促进鱼类生长。

CS 除了提高动物垂体和血浆 GH 水平外,还会间接影响动物生长轴的其它因子。周玉传等(2002)研究表明,CS 除显著提高高邮鸭血清 GH 外还可提高血清中 IGF-1 水平;艾晓杰等(2004)研究表明,CS 显著降低了鹅血清中 SS 水平,并提高了血清中 GH 和 IGF-1 水平;石和荣等(2005a)研究表明,投喂 CSH 能显著促进黄鳍鲷垂体 GH 水平和肝脏 IGF-1 mRNA 表达水平;本研究的结果也表明腹腔注射 CSH 可显著提高尼罗罗非鱼肝脏 IGF-1 mRNA 表达水平。以上这些结果说明 CS 耗竭了 SS,减弱了 SS 对 GH 分泌的抑制作用,使 GH 含量增加,IGF-1 水平也随之增加,从而促进了动物的生长。

GH 发挥生理效应的第一步是与其靶细胞膜上的 GHR 结合,肝脏是 GH 最主要的靶器官,肝脏上 GHR 的表达直接影响 GH 作用的发挥。有关 CS 促生长的研究主要集中在 CS 对动物个体生长、血清中激素水

平如 GH、SS、IGF-I、T 等的方面,至今未见有关 CS 对 GHR 表达调节的研究。本文综合研究了 CS 对垂体-肝脏生长轴的调节作用,结果表明,CSH 可明显促进尼罗罗非鱼的生长并显著提高其生长轴相关基因(垂体 GH、肝脏 GHR、肝脏 IGF-I)的 mRNA 表达。推测 CSH 对尼罗罗非鱼的促生长作用原理可能是:CSH 通过降低垂体 SS 水平来提高垂体 GH 的合成(垂体 GH mRNA 水平提高)和分泌,引起血液循环中 GH 水平上升,进一步刺激肝脏 GHR 和 IGF-I 的合成(肝脏 GHR 和 IGF-I mRNA 表达显著提高),提高肝脏中 GHR 的数量和血液 IGF-I 水平,IGF-I 到达各组织发挥其促生长作用,从而促进尼罗罗非鱼的生长。

### 参 考 文 献

- 丁宏标,陈杰,韩正康,1994. CSH 促进猪生长的研究. 南京农业大学学报, 17(4): 87—91
- 艾晓杰,郑元林,陈伟华等,2004. 半胱胺对鹅生长内分泌的影响. 上海交通大学学报, 38(5): 819—821
- 石和荣,张为民,刘晓春等,2005a. 半胱胺盐酸盐和 LHRH-A 对黄鳍鲷生长激素分泌的影响. 海洋学报, 27(3): 147—153
- 石和荣,张勇,张为民等,2005b. 半胱胺盐酸盐和 LHRH-A 对黄鳍鲷 IGF-I 基因表达和生长的影响. 动物学报, 51(1): 108—116
- 冉雪琴,李文笙,林浩然,2004. SRIF 及 CSH 对斜带石斑鱼脑垂体生长激素合成和分泌的调控. 动物学报, 50(2): 222—230
- 刘均利,1990. 半胱胺耗竭体内生长抑素及其机制. 生理科学进展, 21(3): 271—274
- 林浩然,1999. 鱼类生理学. 广州: 广东高等教育出版社, 210—212
- 林浩然,2000. 神经内分泌学调控鱼类生殖和生长的相互作用. 动物学研究, 21(1): 12—16
- 金光明,潘娟,2006. 半胱胺对雏鸡生长性能的影响. 中国农学通报, 22(6): 17—19
- 周玉传,赵茹茜,陈伟华等,2002. 半胱胺对高邮鸭增重及相关激素分泌和基因表达的影响. 中国兽医学报, 22(2): 160—166
- 闻爱友,金光明,姚尚奎,2005. 半胱胺对皖西白鹅增重及胴体品质的影响. 中国饲料, 12: 15—16, 24
- 贾斌,夏翠梅,代江生等,2003. 半胱胺对羔羊增重及羊毛生长的影响. 黑龙江畜牧兽医, 11: 11—12
- 高腾云,王艳玲,韩正康等,2001. 半胱胺对肉牛增重、采食量和血液激素水平的影响. 华中农业大学学报, 20(3): 259—261
- Kwok R S, Cameron J L, Faller D V, 1992. Effects of cysteamine administration on somatostatin biosynthesis and levels in rat hypothalamus of action. Endocrinology, 131: 2999—3009
- Papchristou D N, Liu J L, Patel Y C, 1994. Cysteamine induced

- reduction in tissue somatostatin immunoreactivity is associated with alterations in somatostatin mRNA. *Regul Pept*, 49(3): 237—247
- Szabo S, Reichlin S, 1981. Somatostatin in rat tissue is depleted by cysteamine administration. *Endocrinology*, 109: 2255—2257
- Xiao D, Lin H R, 2003. Cysteamine—a somatostatin inhibiting agent induced growth hormone secretion and growth acceleration in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Gen Comp Endocrinol*, 134(3): 285—295
- Yunker W K, Chang J P, 2004. Somatostatin-14 actions on dopamine and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-evoked  $Ca^{2+}$  signals and growth hormone secretion. *Neuroendocrinology*, 16(8): 684—694

## EFFECTS OF CSH ON THE GROWTH AND GENE EXPRESSIONS OF THE GROWTH AXIS IN NILE TILAPIA *Oreochromis niloticus*

MA Xi-Lan<sup>1,2</sup>, ZHANG Yong<sup>1</sup>, LIU Xiao-Chun<sup>1</sup>, ZHOU Li-Bin<sup>2</sup>, LIN Hao-Ran<sup>1</sup>

(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. Department of Life Science, Huizhou University and Institute of Biotechnology, Huizhou, 516007)

**Abstract** Regulations of the synthesis and secretion of growth hormone (GH) in teleosts are based on the dual control of hypothalamic stimulators, gonadotropin-releasing hormone (GnRH), dopamine (DA), growth hormone-releasing hormone (GHRH), and hypothalamic inhibitors, somatostatin (SS) and norepinephrine (NE). SS is the main inhibitor of basal and neuroendocrine-stimulated GH release. Cysteamine (CS) is a potent somatostatin depletory, and significantly promotes animal growth. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is a fresh-water fish with sexual dimorphism. The effects of CSH on the growth and expressions of GH, GHR and IGF-I mRNA in Nile tilapia remain unclear. Two experiments, designated as long-period and short-period experiments, were carried out. In the long-period experiment, two hundreds Nile tilapias of similar body weight were randomly assigned into the control group (intraperitoneal injection with phosphate saline) and the CSH group (intraperitoneal injection with CSH, 100 $\mu$ g/g body weight) and fed under the same conditions for 70 days. The absolute growth rates (*AGR*), special growth rates (*SGR*), condition factor (*CF*) and hepatosomatic index (*HSI*) were obtained by measuring the body length, body weight and hepatic weight at different stages. The *AGR<sub>w</sub>* (or *AGR<sub>L</sub>*) of CSH-treated male and female were increased by 26.48% and 21.48% (or 10.58% and 28.90%), respectively, comparing to control group ( $P<0.05$ ). During 0—2, 2—6, and 6—10 weeks, the *SGR<sub>w</sub>* (or *SGR<sub>L</sub>*) of CSH-treated male was elevated by 25.54%, 1.83%, and 49.94% (or 7.87%, 1.08%, and 25.00%), respectively, comparing to the control group ( $P<0.05$ ); similarly, the *SGR<sub>w</sub>* (or *SGR<sub>L</sub>*) of CSH-treated female was increased by 25.10%, 10.82%, and 1.77% (or 8.06%, 33.33%, and 23.08%), respectively ( $P<0.05$ ). Furthermore, the *CF* and *HIS* of the CSH group were also significantly higher than those of the control group ( $P<0.05$ ). In the short-period experiment, one hundred and twenty Nile tilapias of similar body weight were randomly assigned into the control group (intraperitoneal injection with phosphate saline) and the CSH group (intraperitoneal injection with CSH, 100 $\mu$ g/g body weight) and sampled at 6, 12, 24h, and 2 week. Real time quantitative PCR was applied to detect the expressions of GH in pituitary and GHR and IGF-I in liver at different stages after injection. The expressions of GH in pituitary and GHR in liver were elevated at 12h and 24h ( $P<0.05$ ), but showed no changes at 6h and 2 week. The expression of IGF-I in liver was elevated at 6h ( $P<0.05$ ) and returned to the level of control group at 12h, but was elevated significantly at 24h and 2 week ( $P<0.01$ ). The results indicated that CSH could increase the mRNA expressions of GH in pituitary and GHR and IGF-I in liver, and significantly promote growth of Nile tilapia.

**Key words** Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, Cysteamine hydrochloride (CSH), Growth, Gene expression