

绿鳍马面鲈 $ER\alpha$ 基因部分 cDNA 序列克隆及其表达研究

赵梅琳, 温海深, 张冬茜, 何 峰, 李吉方

(中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 雌二醇是与生殖相关的重要的性类固醇激素之一, 它与雌激素受体相结合作用于靶器官从而发挥生物活性。为进一步阐明绿鳍马面鲈雌激素受体 α (Estrogen receptor α , $ER\alpha$) 的生理功能提供了科学依据, 同时也为其人工繁育提供一定的理论基础, 作者利用简并引物扩增得到绿鳍马面鲈 (*Navodon septentrionalis*) $ER\alpha$ 部分 cDNA 序列, 共 1410bp, 编码 470 个氨基酸。通过半定量 RT-PCR 技术分别检测了其在雌鱼、雄鱼中各组织的表达情况, 结果表明 $ER\alpha$ 在雌鱼体内的表达较雄鱼更广泛, 在雌鱼垂体、心脏和卵巢的表达量最高, 在雄鱼的垂体、肝脏、肾脏、精巢也有较高的表达。采用实时定量 RT-PCR 技术, 分析了 $ER\alpha$ 在性腺中的周年表达情况, 卵巢中 $ER\alpha$ mRNA 在 5 月表达量最高, 7 月最低; 精巢中在 5 月最低, 9 月最高。该项研究表明 $ER\alpha$ 与绿鳍马面鲈生殖周期存在密切关联, 提示在性腺发育过程中发挥一定作用。

关键词: 绿鳍马面鲈 (*Navodon septentrionalis*); 雌激素受体; cDNA 部分序列克隆; 组织分布; mRNA 表达
中图分类号: Q 786; S 917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2014)05-0081-08
doi: 10.11759/hyxx20130517005

绿鳍马面鲈 (*Navodon septentrionalis*) 属鲈形目 (Tetraodontiformes) 革鲈科 (Aluteridae), 马面鲈属 (*Navodon*), 英文名 Bluefin leatherjacket, 俗称面包鱼、象皮鱼、马面鱼等^[1]。主要分布于日本、朝鲜半岛, 非洲东岸, 南非以及中国的东海、黄渤海和台湾海峡, 其中东海是中国绿鳍马面鲈产量最大的海区^[2]。20 世纪 80 年代以前, 绿鳍马面鲈是中国海洋捕捞居第二位的重要经济鱼类^[3]。近些年, 由于自然海域资源严重衰退, 加之肉质鲜嫩, 肝脏营养价值高, 绿鳍马面鲈的市场价格明显提高, 绿鳍马面鲈冻鱼片、烤鱼片等诸多产品畅销国内外, 市场前景十分广阔^[1]。

雌激素参与调节生殖、骨骼以及脑的发育, 是一种重要的性类固醇激素。研究表明, 雌激素在体内的重要生理功能是由雌激素受体介导的, 包括核受体介导的基因组效应和膜受体介导的非基因组效应^[4-6]。雌激素受体 (Estrogen receptors, ER) 是核受体超家族成员之一, 其蛋白的分子结构大致划分为六大功能结构域: A/B 区为转录激活区、C 区为 DNA 结合区、D 区为铰链区、E 区为配体结合区和 F 区^[7]。雌激素受体在哺乳动物中有两个基因亚型, 分别为雌激素受体 α ($ER\alpha$) 和雌激素受体 β ($ER\beta$)。由于鱼类中发生了一个额外的基因复制事件, 一些研究报道了上述两种亚型的变体。在虹鲟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[8]、金鱼 (*Carassius auratus*)^[9]、倒刺鲃 (*Spinibarbus*

denticulatus)^[10] 等硬骨鱼类中均发现了两种 $ER\alpha$ 亚型, 而在斑马鱼 (*Danio rerio*)^[11]、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[12]、许氏平鲈 (*Sebastes schlegelii*)^[13] 等硬骨鱼类中均只发现一种 $ER\alpha$ 。从目前的 research 来看, 不同种类的雌鱼、雄鱼的 $ER\alpha$ 显示出不同的组织表达模式。在性成熟倒刺鲃和尼罗罗非鱼中, 性腺、肝脏、肾脏和脑中均检测到 $ER\alpha$ 的分布^[10, 12]; 金鱼中, 垂体的表达量最高, 性腺、肝脏、肠、脑中均有较高的表达^[9]; 许氏平鲈中, $ER\alpha$ 在雌鱼中有丰富的表达, 在卵巢、肝脏、肠、脂肪、肾脏、脑、心、胃、脾、头肾中均有较高表达, 而雄鱼中只在精巢和肝脏检测到较高表达^[13]。目前, 国内外对绿鳍马面鲈分子生物学的研究甚少, 关于其雌激素受体的研究尚未见报道。

作者克隆了绿鳍马面鲈 $ER\alpha$ 基因核心序列, 采用半定量方法分别检测了其在雌鱼、雄鱼多个组织中的表达情况, 并采用实时定量 RT-PCR 方法分析其在卵巢和精巢组织中的周年表达情况。该项研究为进一步阐明绿鳍马面鲈 $ER\alpha$ 的生理功能提供了

收稿日期: 2013-05-17; 修回日期: 2013-07-16

基金项目: 山东省科技攻关计划课题资助项目 (2009GG10005017)

作者简介: 赵梅琳 (1989-), 女, 硕士研究生, 主要从事鱼类繁殖生理学研究, E-mail: meilinhaida@163.com; 温海深, 通信作者, 教授, E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn

科学依据,同时也为其人工繁育提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2010年11月至2011年9月,从烟台百佳水产有限公司每2个月采集1次,每次采样用于本实验的有3尾雄鱼和3尾雌鱼,共36尾。实验鱼规格为体长(20.0~29.5)cm,体质量(195.5~648.8)g。实验鱼麻醉后解剖,收集各组织样品,于-80℃超低温冰箱保存用于基因克隆和表达,并测定各生物学指标,包括体质量、体长、去内脏质量、性腺质量等。计算性腺指数(GSI=[性腺质量/去内脏质量]×100)。

表1 绿鳍马面鲈 ERα cDNA 克隆及表达所用引物

Tab.1 Primers used for *Navodon septentrionalis* ERα cDNA cloning and mRNA expression analysis

基因	目的	引物	序列(5'to 3')
ERα	片段 cDNA 克隆	tsERαF1	CCTGCGAGGGCTGCAARGCNTTYTT
		tsERαR1	GCCAGCAGCATGTCTGAAGATYTCNGCCAT
		tsERαF2	CACTCCACCCCCGGCTAYTAYWSNGC
		tsERαR2	GCCCTTCATCATGCCACACTCARTARCA
		tsERαF3	GGCCCTACACCGAGGTGACNRTNATGAC
	实时荧光定量 RT-PCR(qRT-PCR)	tsERαR3	GACCCGGTGGGCGTCNARCATYTC
		tsERαF4	TGCTCAACTCTGGTGCCTTCT
		tsERαR4	CCGACTGGCTGATGTGATGT
		tsERαF5	AACGATGAGCCGACCCTAC
		tsERαR5	GCAGAAAGAGAAGGCACCAG
18S	qRT-PCR 和半定量 RT-PCR	18SF1	CCTGAGAAACGGCTACCACATC
		18SR1	CCAATTACAGGGCCTCGAAAG

1.4 系统进化树构建

使用 Clustal X 将其与其他物种 ERα 氨基酸序列进行多重序列比对,使用 MEGA 4.0 邻接法(Neighbour-Joining, NJ)构建系统进化树^[15]。

1.5 ERα 的组织表达和周年表达

利用 Primer5.0 软件设计一对特异性引物 tsERαF5 和 tsERαR5。通过半定量 RT-PCR 分析 ERα 在雌鱼和雄鱼的组织分布,包括性腺、肌肉、肠、鳃、肾、胃、脾脏、肝脏、心脏、垂体和脑。PCR 反应条件:94℃预变性 5 min,94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 30 s 共 35 个循环,72℃ 10 min,4℃ 1 h。18S rRNA 作为内参基因,反应条件:94℃预变性 5 min,94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 30 s 共 25 个循环,72℃ 10 min,4℃ 1 h。PCR 产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳,并用 GIS 凝胶成像系统 3.60 软件(Tanon)分析扩

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

绿鳍马面鲈各组织总 RNA 用 RNAiso reagent(Takara)按照说明书进行提取。分用 UV 分光光度法(Ultrospec2100Pro, Amersham)和琼脂糖凝胶电泳进行浓度和完整性检测。各样本的 1 μL 总 RNA 用随机引物和反转录酶 M-MLV(Takara)合成第一链。

1.3 ERα 的克隆及序列分析

根据已知鱼类的 ERα 序列,利用 CodeHop 在线^[14]设计简并引物,如表 1,并以卵巢组织的 cDNA 为模板进行扩增。所得序列用 DNAMAN 软件推算氨基酸序列,并在 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中进行 BLAST 比对和同源性分析。

增条带的光密度。

设计特异性引物 tsERαF4 和 tsERαR4,运用实时定量 qRT-PCR 技术检测 ERα 在精巢、卵巢($n=3$)中的周年表达情况,并以 18S 为内参基因对数据进行分析^[16]。

1.6 数据处理

实验数据用平均数±标准误表示,并采用 SPSS 13.0 软件进行 ANOVA 分析,用 Duncan's 多重比较进行数据处理和检验分析,当 $P<0.05$ 时差异显著。

2 结果

2.1 绿鳍马面鲈雌激素受体 ERα cDNA 核心序列的克隆

克隆得到绿鳍马面鲈雌激素受体 ERα cDNA 核心序列共 1410 bp,按照 DNAMAN V6 的翻译纵览确定该序列的翻译起始位点并进行翻译,该序列编码

[illegible]

图 2 绿鳍马面鲀 ER α 与其他物种 ER α 氨基酸序列比较

Fig. 2 Comparison of amino acid sequences of *Navodon septentrionalis* ER α with other species

符号(*)和(:)分别表示完全保守和保守的氨基酸: 功能域(A/B, C, D, E/F)用箭头标出: P-box、D-box 和 PKA 位点依次用方框标出: 8 个保守的半胱氨酸残基用阴影标出: AF-2 用虚线方框标出

Asterisks (*) and (:) marked for completely conserved and conserved amino acids, respectively. The functional domains (A/B, C, D, E/F) were indicated. P-box, D-box and the PKA site were boxed. The eight conserved cysteines were in shadow. AF-2 was in a dotted box. blERα: *Acanthopagrus schlegelii*, AAL82743; brfERα: *Sebastes schlegelii*, ACN39246; bjERα: *Navodon septentrionalis*, AFV36365; zfERα: *Danio rerio*, AAK16740; hERα: *Homo sapiens*, NP_000116; rERα: *Rattus norvegicus*, BAI48013; xERα: *Xenopus tropicalis*, BAE81788

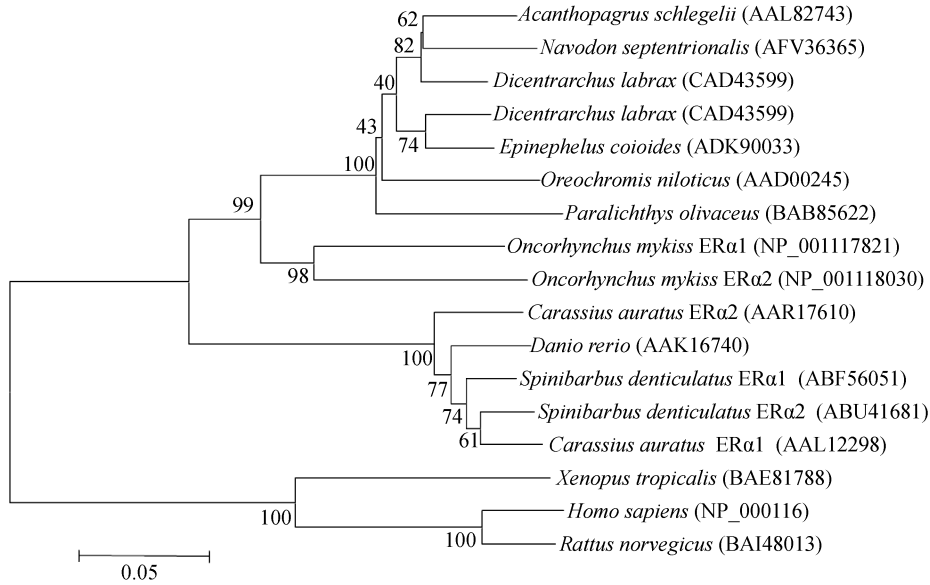


图 3 不同物种的 ERα 氨基酸构建的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of the amino acid sequences of ERα

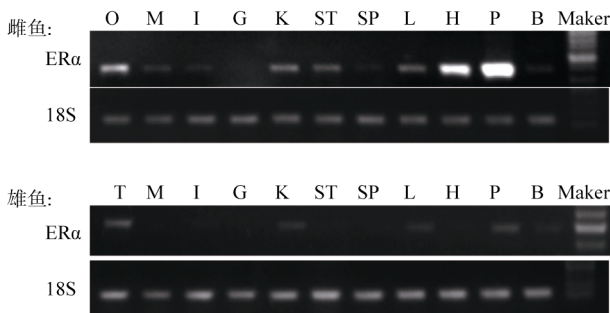


图 4 ERα 在绿鳍马面鲷雌鱼、雄鱼的组织表达

Fig. 4 Tissue distribution of ERα in *Navodon septentrionalis* by RT-PCR

O. 卵巢; T. 精巢; M. 肌肉; I. 肠; G. 腮; K. 肾; ST. 胃; SP. 脾; L. 肝; H. 心; P. 垂体; B. 脑; Marker . DNA 分子量标准
O. ovary; T. testis; M. muscle; I. intestine; G. gills; K. kidney; ST. stomach; SP. spleen; L. liver; H. heart; P. pituitary; B. brain; Marker . DNA molecular weight standards

家族典型的特征：分为 6 个功能区，C 区和 E 区高度保守，且 E 区包含 AF-2 活性功能区。表明该序列为目的序列。

雌激素受体在生物体内广泛表达，其研究具有重要的生理意义。随着 20 世纪 80 年代首次成功克隆得到人 ERα 受体开始^[17]，其在哺乳动物中的研究逐渐兴起。近年来雌激素受体在硬骨鱼中的研究较多。据报道，金鱼 ERα 在垂体中表达信号最强，其他组织次之^[9]；斑马鱼 ERα 在垂体、肝脏、精巢中表达量较高^[11]；金头鲷(*Sparus auratus*)成鱼 ERα 主要在肝脏和垂体中表达^[18]。本研究与上述研究结果相似，绿鳍马

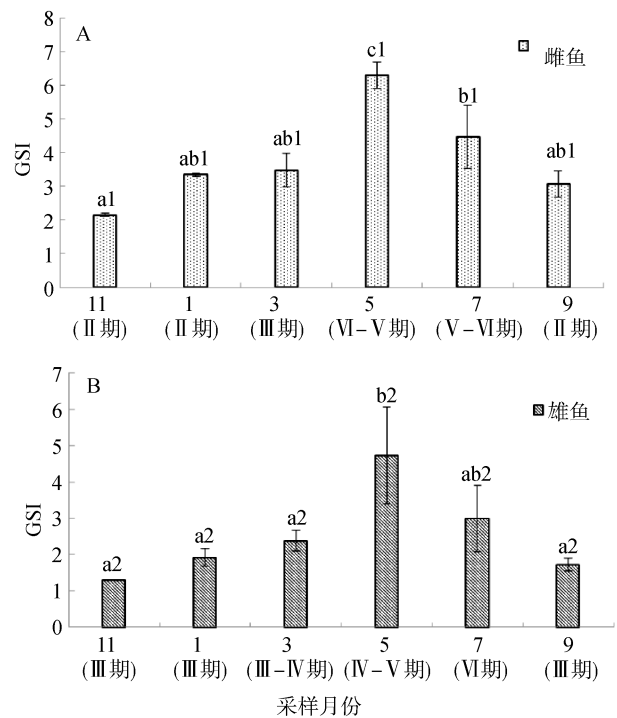


图 5 绿鳍马面鲷雌鱼、雄鱼的 GSI 周年变化

Fig. 5 The annual changes of GSI in female and male *Navodon septentrionalis*

数据均用平均数±标准误差表示，图中不同字母表达存在显著性差异($P < 0.05$, Duncan 氏多重比较); A. 雌鱼; B. 雄鱼

Values were shown as mean±SE and different letters indicate significant difference ($P < 0.05$, one-way ANOVA, followed by Duncan's); A. female; B. male

面鲷 ERα 在垂体、肝脏和性腺中也有较高的表达。已有研究显示，雌激素在中枢神经组织中与其受体结合，

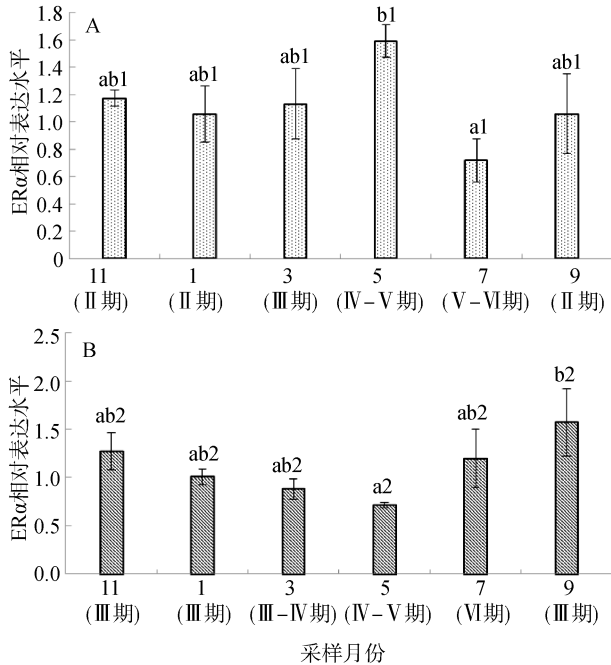


图6 ERα在精巢和卵巢中的周年表达模式

Fig. 6 The relative expression pattern of ERα in ovary and testis of *Navodon septentrionalis* during the annual reproductive cycle

数据均用平均数±标准误表示, 图中不同字母表示存在显著性差异($P<0.05$, Duncan氏多重比较); A. 卵巢; B. 精巢

Values were shown as mean±SE and different letters indicate significant difference ($P<0.05$, one-way ANOVA, followed by Duncan's); A. ovary; B. testis

对生殖行为、神经保护、学习记忆等有重要作用^[19]。雌激素在性腺和肝脏中与雌激素受体结合, 分别调控卵黄蛋白原合成相关基因的表达, 进而影响性腺发育, 调节生殖行为^[10, 20, 21]。

绿鳍马面鲷为周年产卵鱼类, 一般从4月中下旬到6月底为繁殖期^[22], 人工养殖的雌性绿鳍马面鲷, 其生殖周期与野生绿鳍马面鲷生殖周期基本一致。绿鳍马面鲷雌鱼GSI在11月有最低值, 可能是由于鱼体要大量储存能量用以越冬, 只有少量用以性腺发育所致, 与人工养殖半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)进入12月份后GSI显著下降相一致^[22]。从11月到翌年3月, 随着卵巢发育, 卵黄积累, 雌鱼的GSI逐渐升高, 5月开始进入繁殖期, 此时GSI显著高于11月($P<0.05$)。与此同时, 卵巢ERα表达水平也逐渐上升并在5月达到峰值, 推测可能由于卵巢发育后期, 卵黄大量积累, 必须有大量雌激素参与卵母细胞的发育, 此时雄激素大量转化为雌激素所致^[23], 已有研究证实, 雌激素水平的升高与卵黄生成有关^[24]。之后GSI逐渐下降, 由于卵巢完成排

卵并开始退化吸收, 在7月份GSI出现一次显著性降低($P<0.05$), 此时卵巢ERα达到全年最低。9月卵巢完成退化吸收进入重复发育期, GSI有所降低, 卵巢ERα表达量开始回升。绿鳍马面鲷雌鱼GSI的这一变化规律与黄鲷(*Dentex mifron*)^[25]、半滑舌鲷^[22]等硬骨鱼类的研究结果一致。Shi等^[13]的研究结果显示, 许氏平鲷ERα在卵巢发育成熟时有最高水平, 其他时期均保持在较低水平, 与本研究绿鳍马面鲷卵巢ERα变化趋势相似。

绿鳍马面鲷雄鱼GSI变化趋势与雌鱼基本相同。其精巢ERα表达水平与GSI没有直接的相关性。雄鱼GSI在11月出现最低值。随着精原细胞的分裂分化, 精母细胞的逐渐成熟, 翌年5月进入繁殖期并达到峰值, 此时精巢ERα呈下降的趋势, 并在5月达到最低, 可能是由于随着精巢发育成熟雌激素含量减少所致。之后随着GSI的降低, 精巢ERα水平上升。据报道, 鳗鲡(*Anguilla japonica*)、倒刺鲃、许氏平鲷随着精子生成的全部过程, 精巢ERα表达水平逐渐升高, 可以认为雌激素在雄鱼精子发生中是不可或缺的, 但其作用机制尚不明确^[10, 13, 26], 而许氏平鲷ERα的表达水平是否与其卵胎生这一特殊的繁殖方式有关尚不十分清楚, 同时也不排除对部分鱼类特定发育期, 精巢雌激素受体表达研究结果有互相矛盾的现象^[27]。雌激素受体在雄鱼中的机理尚不完全了解, 有待于进一步研究。

作者首次克隆绿鳍马面鲷ERα核心cDNA序列, 并对其进行了基因结构与进化分析, 分别检测了雌鱼、雄鱼的组织表达情况, 同时还研究了ERα在绿鳍马面鲷生殖周期中的表达, 为进一步揭示ERα的生理功能提供科学依据, 同时也为绿鳍马面鲷的人工繁育提供了一定的理论基础。

参考文献:

- [1] 孟宪菊, 张利民. 绿鳍马面鲷的生物学特性及人工养殖前景[J]. 齐鲁渔业, 2009, 26(6): 47-48.
- [2] 李平伦, 李德军, 徐金波, 等. 绿鳍马面鲷海上网箱养殖技术要点[J]. 齐鲁渔业, 2003, 20(10): 10-11.
- [3] 陈莲芳, 郑元甲. 东海绿鳍马面鲷的早期发育和产卵场、产卵期的探讨[J]. 生态学报, 1984, 4(2): 73-79.
- [4] Edwards D P. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone[J]. Annual Review of Physiology, 2005, 67: 335-376.
- [5] Levin E R. Plasma membrane estrogen receptors[J].

- Trends in Endocrinology & Metabolism, 2009, 20(10): 477-482.
- [6] Thomas P, Dressing G, Pang Y, et al. Progesterone, estrogen and androgen G-protein coupled receptors in fish gonads[J]. Steroid, 2006, 71(4): 310-316.
- [7] Krust A, Green S, Argos P, et al. The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors[J]. The EMBO Journal, 1986, 5: 891-897.
- [8] Nagler J J, Krisfalusi M, Cyr D G. Quantification of rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) estrogen receptor messenger RNA and its expression in the ovary during the reproductive cycle[J]. Molecular Endocrinology, 2000, 25: 243-251.
- [9] Choi C Y, Habibi H R. Molecular cloning of estrogen receptor a and expression pattern of estrogen receptor subtypes in male and female goldfish[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2003, 204: 169-177.
- [10] Zhu P, Zhang Y, Zhou Q, et al. Discovery of four estrogen receptors and their expression profiles during testis recrudescence in male *Spinibarbus denticulatus*[J]. General and Comparative Endocrinology, 2008, 156: 265-276.
- [11] Menuet A, Pellegrini E, Anglade I, et al. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions[J]. Biology of Reproduction, 2002, 66(6): 1881-1892.
- [12] Wang D S, Senthilkumaran B, Sudhakumari C C, et al. Molecular cloning, gene expression and characterization of the third estrogen receptor of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2005, 31(2-3): 255-266.
- [13] Shi D, Wen H S, He F, et al. The physiology functions of estrogen receptor a (ER a) in reproduction cycle of ovoviparous black rockfish, *Sebastes schlegeli* Hilgendorf[J]. Steroids, 2011, 76: 1597-1608.
- [14] 陈彩芳, 温海深, 何峰, 等. 程序化设计的简并引物克隆半滑舌鲷 CYP17 基因[J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(6): 1213-1218.
- [15] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. Briefings in bioinformatics, 2004, 5(2): 150-163.
- [16] Mu W J, Wen H S, He F, et al. Cloning and expression analysis of the cytochrome P450c17enzymes during the reproductive cycle in ovoviparous Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*)[J]. Gene, 2013, 512: 444-449.
- [17] Walter P, Green S, Greene G, et al. Cloning of the human estrogen receptor cDNA[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA, 1985, 82(23): 7889-7893.
- [18] Pinto P I, Passos A L, Martins R S, et al. Characterization of estrogen receptor b in sea bream (*Sparus auratus*): phylogeny, ligand-binding, and comparative analysis of expression[J]. General and Comparative Endocrinology, 2006, 145: 197-207.
- [19] McEwen B S, Alves S E. Estrogen action in the central nervous system[J]. Endocrine Reviews, 1999, 20(3): 279-307.
- [20] Campbell C M, Idler D R. Characterization of an estradiol-induced protein from rainbow trout as vitellogenin by the composition and radioimmunological cross reactivity to ovarian yolk fractions[J]. Biology of Reproduction, 1980, 22(3): 605-617.
- [21] Sabo A T, Kroll K J, Denslow N D. Differential expression of largemouth bass(*Micropterus salmoides*) estrogen receptor isotypes alpha, beta, and gamma by estradiol[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2004, 218(1-2): 107-118.
- [22] 陈彩芳, 温海深, 陈晓燕, 等. 人工养殖半滑舌鲷卵巢发育及其产卵类型研究[J]. 海洋科学, 2010, 34(8): 29-34.
- [23] 方永强, 翁幼竹, 胡晓霞. 性类固醇激素及其受体在文昌鱼性腺和神经系统中的分布[J]. 动物学报, 2001, 47(4): 398-403.
- [24] Lubzens E, Young G, Bobe J, et al. Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed [J]. General and Comparative Endocrinology, 2010, 165(3): 367-389.
- [25] 施兆鸿, 王建钢, 高露姣, 等. 南海黄鲷性腺发育的初步研究[J]. 台湾海峡, 2006, 25(3): 353-359.
- [26] Miura T, Miura C, Ohta T, et al. Estradiol-17 β

stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999, 264: 230-234.

[27] 温海深, 董双林. 硬骨鱼类雌激素受体及其在生殖调节中的作用研究[J]. 中国海洋大学学报, 2008, 38(3): 367-370.

Cloning of partial cDNA of estrogen receptor α and expression analysis during the reproductive cycle in *Navodon septentrionalis*

ZHAO Mei-lin, WEN Hai-shen, ZHANG Dong-qian, HE Feng, LI Ji-fang
(College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: May, 17, 2013

Key words: *Navodon septentrionalis*; estrogen receptor α (ER α); partial cDNA cloning; tissue distribution; mRNA expression

Abstract: Estrogens are critical sex steroid hormones involved in reproduction. And they need to bind to estrogen receptors (ER) in target organ for biological activity. To explore the physiological function of estrogen receptor α (ER α) in *Navodon septentrionalis* and provide some theoretical basis for artificial breeding, a partial cDNA sequence of *N. septentrionalis* ER α gene was obtained by degenerate primer PCR amplification. The length of the cDNA sequence is 1410 bp, and encodes 470 amino acids. The tissue expression analysis using semi-quantitative RT-PCR showed that it had a more restricted distribution in male fish. In female, pituitary, heart and ovary had high expression levels, and in male, pituitary, liver, kidney and testis had relatively high expression levels. In addition, we analyzed the relative expression level of ER α in reproductive cycle in ovary and testis by quantitative RT-PCR, respectively. It revealed that the highest expression level was in May, and the lowest in July in ovary, while in testis, the lowest was in May, and the highest in September. This study indicates that ER α has a strong relationship with the reproductive cycle of *N. septentrionalis*, suggesting ER α should play a role in gonads development.

(本文编辑: 谭雪静)