

# 适宜浓度的维生素 E 促进半滑舌鳎生长激素基因的表达

王蔚芳<sup>1</sup>, 向玲<sup>2</sup>, 王琳<sup>1</sup>, 黄滨<sup>1</sup>, 李会涛<sup>3</sup>

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003; 3. 山东百福生物科技有限公司, 山东 济宁 273200)

**摘要:** 本实验旨在探究维生素 E 对半滑舌鳎垂体组织中生长激素基因表达的影响。作者在每千克等氮等能的基础饲料中分别添加 0、400 和 1 600 mg 的 DL- $\alpha$ -生育酚乙酸酯 (维生素 E) 投喂半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 成鱼 (464 $\pm$ 2.6) g, 进行为期 8 周的养殖实验; 另外, 在 L-15 培养基中添加 0、18 和 54  $\mu$ mol/L 的维生素 E, 对半滑舌鳎成鱼 (464 $\pm$ 2.6) g 的垂体细胞进行为期 3 d 的体外原代培养实验。分别取垂体组织和原代细胞, 通过荧光实时定量 PCR 分析其 *gh* mRNA 的相对表达量。实验结果表明: 垂体组织中 *gh* mRNA 的相对表达量随着饲料中维生素 E 含量的增加而呈现先升高后下降的变化趋势, 在 400 mg/kg 组时显著高于其他各组 ( $P < 0.05$ ); 随着细胞培养液中维生素 E 浓度的升高, *gh* mRNA 的相对表达量显著增加 ( $P < 0.05$ )。由此可见, 适宜浓度的维生素 E 能够促进半滑舌鳎垂体组织中生长激素基因的表达。

**关键词:** 半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*); 维生素 E; 生长激素基因; 养殖; 垂体原代细胞

中图分类号: S968.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2020)02-0113-07

DOI: 10.11759/hyxx20190802001

生长激素是一种由垂体前叶合成和分泌的多肽类激素, 能够不通过靶腺而刺激生长, 动员脂肪分解, 促进蛋白质的合成, 抑制葡萄糖的氧化, 提高对钾、钙、磷、硫等元素的利用<sup>[1]</sup>。相关研究表明生长激素能够促进鱼类的骨骼生长与肌肉蛋白质的合成<sup>[2]</sup>。

维生素 E 又名生育酚, 最初发现时被认为是维持动物正常生殖所必需的一种脂溶性物质<sup>[3]</sup>。维生素 E 在鱼类生长、免疫功能等方面的研究已逐渐成为热点<sup>[4, 5]</sup>。摄食维生素 E 含量为 150 mg/kg 饲料的点带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*), 其增质量率显著提高<sup>[6]</sup>。用添加维生素 E 的配合饲料投喂鳊鱼 (*Mugil cephalus*) 幼苗, 能够有效地促进其生长<sup>[7]</sup>。关于维生素 E 如何调控鱼类的生长, 是否与生长激素有关, 至今未见相关研究报道, 因此值得进一步探讨。尽管维生素 E 是重要的抗氧化剂<sup>[8, 9]</sup>, 但它还被证明可作为基因的表达因子<sup>[10]</sup>。新近水生动物研究表明适宜浓度的维生素 E 能够促进大菱鲂促性腺激素基因的表达<sup>[11]</sup>。在陆生动物研究中指出, 饲料中添加 15 IU/kg 维生素 E 时, 蛋雏鸭血清生长激素含量显著高于对照组<sup>[12]</sup>; 此外, 青大麦叶提取物 (已鉴定为  $\alpha$ -生育酚琥珀酸酯) 可以促进体外培养的大鼠垂体前叶细胞分泌 GH<sup>[13]</sup>。

因此作者假设维生素 E 通过基因调节的功能影响生长激素基因的表达。

半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 属 鲽 形 目 (Pleuronectiformes)、鳎亚目 (Soleoidei)、舌鳎科 (*Cynoglossidae*)、舌鳎属 (*Cynoglossu*), 为中国的本地种, 主要分布在中国的黄渤海海域<sup>[14]</sup>。其体型大、生长快、味道鲜美、高蛋白、营养丰富、经济价值高, 在中国的养殖规模也逐渐扩大<sup>[15]</sup>。半滑舌鳎与大菱鲂、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 同为中国最具发展潜力的工厂化养殖和土池养殖的海水产品<sup>[16]</sup>。目前已经开展了关于半滑舌鳎生长激素基因在大肠杆菌中原核表达的研究<sup>[17]</sup>, 以及半滑舌鳎生长激素基因的多态性与生长激素及生长性状相关性的研究报道<sup>[2]</sup>; 此外, 在饲料中添加 1 200 mg/kg 的维生素 E 可以有效提升半滑舌

收稿日期: 2019-08-02; 修回日期: 2019-10-14

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31872578); 国家自然科学基金青年项目 (31502177)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No. 31872578, No.31502177]

作者简介: 王蔚芳 (1980-), 女, 吉林通化人, 副研究员, 主要从事水产动物营养相关研究, E-mail: wangwf@ysfri.ac.cn; 李会涛, 通信作者, E-mail: yulees@163.com

鳎亲鱼的繁殖性能<sup>[18]</sup>, 在饲料中添加 1 084.58 mg/kg 的维生素 E 饲喂半滑舌鳎幼鱼 84 d, 经迟缓爱德华氏菌攻毒后, 能有效降低其红细胞的过氧化损伤<sup>[19]</sup>。而关于半滑舌鳎维生素 E 和生长激素关系的研究未见报道。因此, 参照半滑舌鳎垂体细胞体外原代培养方法<sup>[20]</sup>, 借助养殖和细胞培养实验, 探究不同含量的维生素 E 与垂体组织中(养殖实验)和垂体原代培养细胞中(细胞实验) *gh* mRNA 相对表达量之间的关系, 初步讨论维生素 E 促生长的分子机制, 并为半滑舌鳎人工配合饲料的研制提供参考。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 实验用鱼

实验用 120 条体质量为(464±2.6)g 健康的 1 龄半滑舌鳎雌性成鱼, 购自莱州明波水产有限公司(山东, 莱州), 为当年孵化和培育的同一批鱼。

### 1.2 饲料制备与养殖管理

养殖实验的饲料中维生素 E 添加量是参照肖登元等<sup>[18]</sup>在半滑舌鳎亲鱼饲料中的添加量(0、200 和 1 200 mg/kg)报道以及作者的预实验结果进行设置。本实验设 3 个组, 每组设 3 个重复, 每组饲料中维生素 E 的添加量分别是 0、400 和 1 600 mg/kg。维生素 E 以 DL- $\alpha$ -生育酚乙酸酯(Sigma)的形式按照计算比例逐级混匀到次粉中。在基础饲料中, 以鱼粉、酪蛋白为主要蛋白源, 以鱼油、豆油为主要脂肪源, 饲料配方及营养组成如表 1。固体原料均过 60 目筛, 所有原料充分混合均匀后, 通过机械挤压形成颗粒饲料(4 mm), 并在 60℃ 的烘箱中干燥至湿度为 10%, 用密封塑料袋保存在-20℃ 的冰柜中以供使用<sup>[18]</sup>。

养殖实验在莱州明波水产有限公司养殖场进行。正式实验开始前对所有的鱼投喂 7 d 的基础饲料(表 1), 以适应实验条件。在测量鱼体长和称重后随机分成九组到 9 个 15 m<sup>3</sup> 的圆形聚乙烯养殖桶中(直径: 150 cm, 高度: 60 cm)进行流水养殖实验, 每个桶里放养半滑舌鳎 10 尾, 养殖用水为过滤海水, 流速是 50 L/min。每 3 个养殖桶随机分成一组投喂相同的饲料, 每天早晚 2 次投喂, 投喂率为鱼体质量的 2%, 进行为期 8 周的养殖实验。实验期间水温范围为 24℃~27℃; 盐度 30~31, pH 为 7.8~8.1。溶解氧含量大于 5.65 mg/L。每天早上清除粪便和多余的饲料以保持良好的水质条件。

表 1 实验基础饲料配方组成及营养组成  
Tab. 1 Formulation and proximate composition of the experimental diet

组成成分	成分配比 (% , 干质量)
鱼粉	60.0
酪蛋白	10.0
高筋粉	14.95
磷脂	2.0
鱼油	7.0
大豆油	1.0
胆碱	0.5
磷酸二氢钙 Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1.0
维生素 C	0.5
维生素混合物 <sup>1</sup>	1.0
矿物质混合物 <sup>2</sup>	1.0
乙氧喹	0.05
海藻酸钠	1.0
营养成分分析	
粗蛋白	56.0
脂肪	14.1
灰分	10.2
维生素 E (mg/kg)	8.0

注: <sup>1</sup> 维生素混合物(mg/kg 或 g/kg 饲料): 硫酸素, 25 mg; 核黄素, 45 mg; 盐酸吡哆醇, 20mg; 维生素 B<sub>12</sub>, 0.1 mg; 维生素 K<sub>3</sub>, 10 mg; 肌醇, 800 mg; 泛酸, 60 mg; 烟酸, 200 mg; 叶酸, 20 mg; 生物素, 1.20 mg; 维生素 A, 32 mg; 维生素 D, 5 mg; 维生素 E, 0mg; 次粉, 13.67 g; <sup>2</sup> 矿物质混合物(mg/kg 或 g/kg 饲料): 硫酸镁, 1200 mg; 硫酸铜, 10 mg; 硫酸锌, 50 mg; 硫酸铁, 80 mg; 硫酸锰, 45 mg; 氟化钠, 2 mg; 氯化钴(1%), 50 mg; 硒代硫酸钠(1%), 20 mg; 碘酸钙(1%), 60 mg; 沸石, 13.485 g

### 1.3 垂体原代细胞培养

#### 1.3.1 细胞培养基配制

先取 4.76 g Hepes 和 9.6 g L-15 培养基, 充分混溶于水, 4 h 后用 NaOH 将 pH 调至 7.4, 抽滤(除菌), 分装, 即制成 L-15 基础培养基。在 L-15 基础培养中加入胎牛血清(终浓度为 5%)、青霉素(终浓度为 100 U/mL)、链霉素(终质量浓度为 100 μg/mL), 即制成完全培养基, 4℃ 下保存。所有操作在细胞培养室进行, 有专用橱柜和冰箱放置物品, 所有解剖工具、器皿等经高压消毒后使用, 实验过程中用的水、磷酸缓冲液(PBS)等为无菌型商品。

#### 1.3.2 细胞分离

在细胞培养室的准备室内, 用 75%酒精浸泡鱼头后, 无菌条件下取 20 条成鱼垂体组织, 移入超净工作台内后更换培养液和培养皿, 保证无菌操作。随后垂体组织剪成 1 mm<sup>3</sup> 小块, 用 PBS 冲洗, 加入

0.25%的胰蛋白酶,用量约为组织块的 10 倍,放入 18℃水浴锅中 45 min。水浴后用 2 mL PBS 吹打组织块,倒入 200 目/70μm 的尼龙网过滤,取滤液以 100 g/min 的速度离心 10 min,除去上清液,并重悬沉淀,分装至六孔板,1 mL/孔,置于 24℃培养箱中进行培养。

### 1.3.3 细胞培养

细胞培养液中维生素 E 浓度是参照大菱鲆的相关研究<sup>[11]</sup>,细胞实验分 3 组,每组 3 个重复,维生素 E 的添加量分别为 0、18 和 54 μmol/L。将维生素 E 预先溶解在无水乙醇中,然后加入到 L-15 完全培养基中(无水乙醇的终浓度为 0.1%, v/V),置于 24℃培养箱中培养 3 d<sup>[20]</sup>。

### 1.4 RNA 的提取与 cDNA 文库的构建

养殖实验结束后,分别在每个养殖桶随机取 3 尾鱼,无菌取出垂体组织;细胞实验结束后,将每孔垂体细胞转移至 15 mL 离心管中,以 100 g/min 的速度离心 10 min 之后取细胞沉淀。加入 1 mL TRIzol (Invitrogen, USA),按照程序提取总 RNA,使用 Nanodrop2000 定量并调整至相同浓度备用,并取适量 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳,检测 RNA 完整度,取质量较好的 RNA 作为 cDNA 文库构建的模板。

以总 RNA 模板构建 cDNA 文库,选用 Prime-

Script RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(Takara, Japan)进行反转录实验,操作流程参照该使用说明书进行,制成的 cDNA 文库保存于-20℃冰柜中。

### 1.5 定量 PCR 分析

在 GeneBank 中获得半滑舌鲷生长激素基因序列(HQ334196),通过 Primer Premier 5 软件进行引物设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成,引物浓度为 10 μmol/L。应用实时荧光定量 PCR(qPCR)分析不同水平维生素 E 条件处理下生长激素基因的表达情况。以 20×cDNA 稀释液为模板,进行荧光定量 PCR 扩增,参照 TB Green Premix Ex Taq II(Tli RNaseH Plus)(Code No. RR820A)试剂盒说明,扩增体系为 20 μL(包括 10 μL TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus), 0.8 μL PCR Forward Primer, 0.8 μL PCR Reverse, 1 μL cDNA 模板, 7.4 μL RNase-free dH<sub>2</sub>O)。为减小实验误差,每个样品均设置 3 个重复,18S 核糖体 RNA 基因作为内参引物<sup>[21]</sup>,与目的基因在相同条件下进行扩增,引物序列见表 2。反应按 95℃ 10 min, 95℃ 10 s, 58.4℃ 15 s, 72℃ 20 s, 再依次按照 95℃ 15 s, 60℃ 15 s, 95℃ 15 s 绘制溶解曲线。实验中 PCR 产物通过溶解曲线确定扩增准确性及特异性,使用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法计算 mRNA 相对表达水平<sup>[22]</sup>。

表 2 实时荧光定量 PCR 引物序列

Tab. 2 The primer sequences used in the present study

名称	序列(5'→3')	用途	大小(bp)	扩增效率(%)	相关系数(R <sup>2</sup> )
<i>gh</i> -F	GCCAGTGATGGAGCAGAG	qPCR 引物	117	100.4	0.996
<i>gh</i> -R	GGCCAGCAGTTCGTAGTT				
<i>18s</i> -F <sup>[21]</sup>	GGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC	内参	113	94.7	1.000
<i>18s</i> -R <sup>[21]</sup>	AGTGGGGTTCAGCGGGTTAC				

### 1.6 数据统计分析

研究中所有实验均设置 3 个平行处理,所得数据均以平均值±标准误差表示,并通过 SPSS 19 软件进行 one-way ANOVA 分析及基于 LSD 最小显著差异法的多重比较。当 P 值<0.05 时,认为具有显著差异。

## 2 结果

从图 1 中可知,摄食维生素 E 含量为 400 mg/kg 饲料的实验组的鱼的 *gh* 表达水平显著高于其他各组 (P<0.05); 当维生素 E 添加量为 1 600 mg/kg 时, *gh* 表达量为 1.91%, 显著高于对照组的 1.13%(P<0.05)。

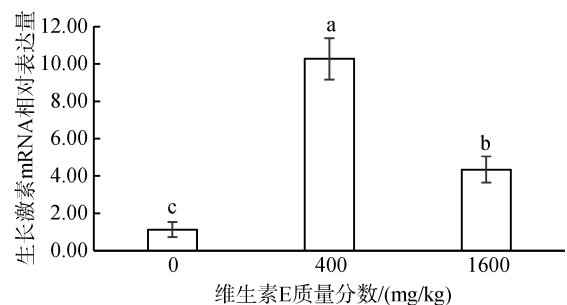


图 1 饲料中维生素 E 含量对半滑舌鲷垂体组织中生长激素 mRNA 表达的影响

Fig. 1 Effect of dietary vitamin E content on *gh* mRNA expression in pituitary tissue of half smooth tongue sole

在细胞实验中,随着维生素E浓度的升高,*gh* mRNA表达量显著上升( $P<0.05$ ),当维生素E浓度为54  $\mu\text{mol/L}$ 时,*gh* mRNA表达量最大(图2)。

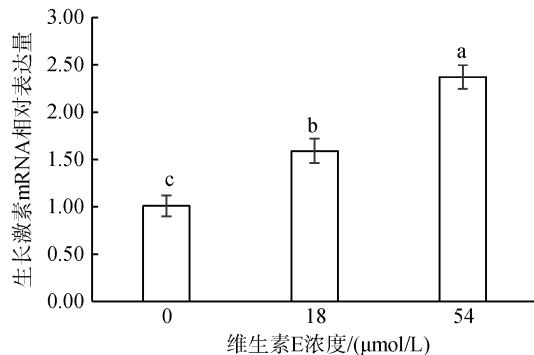


图2 维生素E浓度对半滑舌鲷垂体原代细胞中生长激素mRNA表达的影响

Fig. 2 Effect of vitamin E concentration on *gh* mRNA expression in primary pituitary cells of half smooth tongue sole

### 3 讨论

鱼类生长激素是由鱼类脑垂体前叶合成分泌的由191个氨基酸组成的单链多肽,为非糖蛋白激素,且具有明显的种族特异性<sup>[23]</sup>。其作为信号分子与遍布组织的生长激素受体结合,启动细胞内的信号转导机制,活化一系列信号蛋白,调节基因的表达。生长激素对机体的主要代谢功能表现为促进体组织的生长及细胞体积和数量的增加<sup>[24]</sup>。研究表明饲料中添加维生素E对罗非鱼(*Oreochromis Niloticus*)<sup>[25]</sup>、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)<sup>[26]</sup>、云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)<sup>[27]</sup>的生长有明显的促进作用。维生素E的促生长作用是否与生长激素有关?目前关于维生素E调控生长激素水平的研究报道有限且集中在陆生动物中,但其体内、体外研究结果相似,即维生素E可以提高生长激素水平<sup>[12, 13, 28]</sup>。在本养殖实验中,饲料中添加维生素E显著上调半滑舌鲷*gh* mRNA的表达量( $P<0.05$ ),这提示维生素E有可能参与并促进了*gh* mRNA的表达。为了规避体内众多因素的干扰,作者开展了体外细胞培养实验,进一步验证维生素E和*gh* mRNA的表达的相关性。在体外垂体原代细胞培养中,*gh* mRNA表达量随着细胞培养液中维生素E浓度的升高而显著增加( $P<0.05$ ),证实了维生素E确实参与并促进了*gh* mRNA的表达,也进一步为养殖实验的结论提供了依据。

虽然维生素E参与了*gh* mRNA的表达,但本实验数据显示维生素E的应用剂量会影响*gh* mRNA的表达水平。在饲料中添加400 mg/kg维生素E时,*gh* mRNA表达量最高,而进一步添加至1 600 mg/kg时其表达量显著降低( $P<0.05$ ),这也与实验鱼的生长数据吻合,即1 600 mg/kg时半滑舌鲷的增质量率显著低于400 mg/kg组( $P<0.05$ ),且对应的半滑舌鲷的死亡率显著高于400 mg/kg组( $P<0.05$ )(数据待发表)。这说明*gh* mRNA表达量受维生素E剂量的影响。相关研究也指出,维生素E缺乏或者过量都会影响鱼的生长<sup>[29]</sup>。然而本研究体外细胞实验结果没有出现下调现象,这可能与维生素E的浓度设置有关,因为其浓度梯度的设置是参考相关实验设计而没有进一步增加其梯度,在今后开展相关研究实验时有必要考虑这一点。目前,几乎未见关于维生素E和*gh* mRNA表达的相关报道,其相互关系和作用机制值得进一步探讨和研究。

关于维生素E调控基因表达的机制尚未十分明确。相关研究指出,*gh* mRNA的合成依靠 $\text{Ca}^{2+}$ 胞吐作用方式,且环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB)的磷酸化在*gh* mRNA合成表达的信号通路中起着关键的作用<sup>[30]</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的上调会抑制CREB磷酸化过程,从而可能影响*gh* mRNA的转录过程<sup>[31]</sup>。据此分析,维生素E作为抗氧化剂能与氧化型低密度脂蛋白进行有效拮抗刺激 $\text{Ca}^{2+}$ 的摄入作用,从而抑制细胞内钙离子浓度的升高<sup>[32]</sup>,引起下游信号调控基因的表达。另外一种可能则是维生素E通过与生育酚转运蛋白或者ATP结合转运蛋白结合的方式直接转运到垂体细胞内,作为基因调节因子,从而影响*gh* mRNA合成表达。也可能是维生素E通过改变相关代谢酶的活性(蛋白激酶C、磷酸酯酶A2等)<sup>[33, 34]</sup>引起下游信号蛋白CREB磷酸化从而调节*gh* mRNA的表达。本实验结果表明了维生素E对*gh* mRNA表达的促进作用,且为证明维生素E作为基因调节因子提供了依据。

### 4 结论

本研究表明维生素E能够上调*gh* mRNA的表达,但应用剂量要适宜。在本实验条件下,饲料中添加400 mg/kg维生素E时,*gh* mRNA表达量最高,而进一步添加至1 600 mg/kg时会抑制其表达。

#### 参考文献:

[1] 刘守仁. 生长激素作用的分子机制[J]. 新疆农业科

- 学, 2001, S1: 51-53.
- Liu Shouren. Molecular mechanism of growth hormone action[J]. Xinjiang Agricultural Science, 2001, S1: 51-53.
- [2] 赵君丽, 何峰, 温海深, 等. 雄性半滑舌鳎 GH 基因多态性与激素水平及生长性状相关性分析[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2014, 44(12): 35-40.  
Zhao Junli, He Feng, Wen Haishen, et al. Correlation between the polymorphism of GH gene of male half-smooth tongue sole and their growth traits and hormone content[J]. Periodical of Ocean University of China, 2014, 44(12): 35-40.
- [3] Bender D A. Nutritional biochemistry of the vitamins[M]. New York: Cambridge University Press, 1995: 87-105.
- [4] Alves Martins D, Afonso L O B, Hosoya S, et al. Effects of moderately oxidized dietary lipid and the role of vitamin E on the stress response in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.)[J]. Aquaculture, 2007, 272(1-4): 573-580.
- [5] Jobling M. Fish nutrition research: past, present and future[J]. Aquaculture International, 2016, 24(3): 767-786.
- [6] 邢克智, 郭永军, 陈成勋, 等. 维生素 E 对点带石斑鱼生长及其组织抗氧化性能的影响[J]. 饲料研究, 2015, 14: 48-52, 60.  
Xing Kezhi, Guo Yongjun, Chen Chengxun, et al. Effects of vitamin E on growth and antioxidant properties of grouper[J]. Feed Research, 2015, 14: 48-52, 60.
- [7] Wassef E A, Masry M H, Mikhail F R. Growth enhancement and muscle structure of striped mullet, *Mugil cephalus* L. fingerlings by feeding algal meal-based diets[J]. Aquaculture Research, 2001, 32(1): 315-322.
- [8] Packer J E, Slater T F, Willson R L. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C[J]. Nature, 1979, 278: 737-738.
- [9] 肖涛, 王维娜, 王安利, 等. 维生素 E 对水生动物抗氧化作用的研究进展[J]. 海洋科学, 2007, 31(5): 76-79.  
Xiao Tao, Wang Weina, Wang Anli, et al. Research progress on antioxidant effect of vitamin E on aquatic animals[J]. Marine Sciences, 2007, 31(5): 76-79.
- [10] Galli F, Azzi A, Birringer M, et al. Vitamin E: emerging aspects and new directions[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2017, 102: 16-36.
- [11] Huang Bin, Wang Na, Shi Bao, et al. Vitamin E stimulates the expression of gonadotropin hormones in primary pituitary cells of turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Aquaculture, 2019, 509: 47-51.
- [12] 王思维, 王安. 维生素 E 对笼养蛋雏鸭免疫功能及血液中激素指标的影响[J]. 中国饲料, 2013, 5: 26-29.  
Wang Siwei, Wang An. Effects of vitamin E on immune function and hormone index in caged duck[J]. China Feed, 2013, 5: 26-29.
- [13] Badamchian M, Spangelo B L, Bao Y, et al. Isolation of a vitamin E analog from a green barley leaf extract that stimulates release of prolactin and growth hormone from rat anterior pituitary cells invitro[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 1994, 5(3): 145-150.
- [14] 柳学周. 半滑舌鳎繁殖及养殖技术(上)[J]. 科学养鱼, 2006, 10: 16-17.  
Liu Xuezhou. Artificial propagation and culture technique of half-smooth tongue-sole (continued)[J]. Scientific Fish Farming, 2006, 10: 16-17.
- [15] 柳学周, 庄志猛. 半滑舌鳎繁殖理论与养殖技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2014: 428.  
Liu Xuezhou, Zhuang Zhimeng. Theory of artificial propagation[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2014: 428.
- [16] 宋文涛. 我国半滑舌鳎养殖及研究进展[J]. 科技经济导刊, 2016, 20: 95.  
Song Wentao. Advances in the farming and the research of tongue sole in China[J]. Technology and Economic Guide, 2016, 20: 95.
- [17] 马骞, 柳淑芳, 庄志猛, 等. 半滑舌鳎生长激素及其受体基因的原核表达[J]. 中国水产科学, 2012, 19(6): 956-962.  
Ma Qian, Liu Shufang, Zhuang Zhimeng, et al. Prokaryotic expression of growth hormone and its receptor genes in the tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(6): 956-962.
- [18] 肖登元, 梁萌青, 王新星, 等. 饲料中添加不同水平的维生素 E 对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) 亲鱼繁殖性能及后代质量的影响[J]. 渔业科学进展, 2015, 36(2): 125-132.  
Xiao Dengyuan, Liang Mengqing, Wang Xinxing, et al. Effects of different levels of dietary vitamin E on the reproductive performance and offspring quality of tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(2): 125-132.
- [19] 朱国霞, 黄亚冬, 程民杰, 等. 维生素 E 对半滑舌鳎抗迟缓爱德华氏菌感染的影响[J]. 饲料研究, 2013, 9: 1-4.  
Zhu Guoxia, Huang Yadong, Cheng Minjie, et al. Effects of vitamin E on *Edwardsiella tarda* infection in half-smooth tongue-sole[J]. Feed Research, 2013, 9: 1-4.
- [20] 黄滨, 王娜, 史宝, 等. 半滑舌鳎垂体细胞体外原代培养方法研究[J]. 水产研究, 2017, 4(3): 71-78.  
Huang Bin, Wang Na, Shi Bao, et al. The primary culture method on pituitary cells *In Vitro* of half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* [J]. Open Journal of Fisheries Research, 2017, 4(3): 71-78.

- [21] Shi Bao, Liu Xuezhou, Xu Yongjiang, et al. Molecular characterization of three gonadotropin subunits and their expression patterns during ovarian maturation in *Cynoglossus semilaevis*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16: 2767-2793.
- [22] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method[J]. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [23] 匡刚桥, 刘臻, 鲁双庆, 等. 鱼类生长激素基因的研究现状及展望[J]. 水利渔业, 2006, 26(6): 1-3.  
Kuang Gangqiao, Liu Zhen, Lu Shuangqing. Status and prospects about the research of growth hormone genes in fishes[J]. Journal of Water and Fishery, 2006, 26(6): 1-3.
- [24] 李雨萌, 洪盼, 兰海楠, 等. 生长激素促进细胞增殖机理的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(1): 147-152.  
Li Yumeng, Hong Pan, Lan Hainan. Research progress on mechanism of growth hormone promoting cell growth[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2015, 42(1): 147-152.
- [25] 佐藤秀一, 竹内俊郎, 渡边武. 罗非鱼对 VE 的需求量及其与饲料脂质含量的关系[J]. 水利渔业, 1989, 6: 48-51, 54.  
Sato Syuuiti, Takeuti Tosirou, Watanabe Takesi. The demand of VE for tilapia and its relationship with feed lipid content[J]. Water Fisheries, 1989, 6: 48-51, 54.
- [26] 蔡中华, 邢克智, 董双林, 等. 维生素 E 对鲤鱼健康的影响[J]. 动物学报, 2001, 47(S1): 120-124.  
Cai Zhonghua, Xing Kezhi, Dong Shuanglin, et al. Effects of vitamin E on carp health[J]. Journal of Animal, 2001, 47(S1): 120-124.
- [27] 张艳亮, 彭士明, 高权新, 等. 饲料维生素 E 水平对云纹石斑鱼幼鱼生长、营养及免疫指标的影响[J]. 海洋渔业, 2015, 37(2): 156-163.  
Zhang Yanliang, Peng Shiming, Gao Quanxin, et al. Effects of dietary vitamin E contents on growth, nutrition and immunity in juvenile *Epinephelus moara*[J]. Marine Fisheries, 2015, 37(2): 156-163.
- [28] Chany W, Combs G, Scanes C J. The effects of dietary vitamin E and selenium deficiencies on plasma thyroid and thymic hormone concentrations in the chicken[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2005, 29(3): 265-273.
- [29] 张志强, 蒋明, 文华, 等. 胭脂鱼幼鱼对饲料中维生素 E 需要量的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2017, 45(2): 23-30, 36.  
Zhang Zhiqiang, Jing Ming, Wen Hua, et al. Dietary vitamin E requirement of juvenile Chinese sucker (*Myxocyprinus asiaticus*). Journal of Northwest A & F University (Nat. Sci. Ed.), 2017, 45(2): 23-30, 36.
- [30] 丁晓聪. 喹赛多调控大鼠垂体腺瘤 *gh3* 细胞生长激素表达的机理研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.  
Ding Xiaocong. Study on the mechanism of Cyadox regulating growth hormone expression in GH3 cells of pituitary adenoma in rats[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016.
- [31] 宋杨, 张海燕, 孙雅萍, 等. 慢性铝暴露对大鼠海马钙离子稳态及 CaMK II 和 CREB 活性的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(21): 6001-6005.  
Song Yang, Zhang Haiyan, Sun Yaping, et al. Effect of chronic aluminum exposure on calcium homeostasis and activities of CaMK II and CREB in hippocampus of rats[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2015, 35(21): 6001-6005.
- [32] 徐雅琴, 唐朝枢. 氧化型低密度脂蛋白和抗氧化剂对人血管内皮细胞钙转运的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2000, 8(1): 32-34.  
Xu Yaqin, Tang Chaoshu. The Effect of oxidized low-density lipoprotein and antioxidant on calcium transportation of human vascular endothelial cells[J]. Chinese Journal of Arteriosclerosis, 2000, 8(1): 32-34.
- [33] Mahoney C W, Azzi A. Vitamin E inhibits protein kinase c activity[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1988, 154: 694-697.
- [34] 左兆云, 罗海玲. 维生素 E 的基因调控作用[J]. 中国草食动物科学, 2012, S1: 116-119.  
Zuo Zhaoyun, Luo Hailing. Gene regulation of vitamin E[J]. China Herbivore Science, 2012, S1: 116-119.

# An appropriate concentration of vitamin E promotes gene expression of growth hormone in *Cynoglossus semilaevis*

WANG Wei-fang<sup>1</sup>, XIANG Ling<sup>2</sup>, WANG Lin<sup>1</sup>, HUANG Bin<sup>1</sup>, LI Hui-tao<sup>3</sup>

(1.Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology of Qingdao, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2.College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 3.Shandong Baifu Biotech Co., Ltd., Jining 273200, China)

**Received:** Aug. 2, 2019

**Key words:** *Cynoglossus semilaevis*; vitamin E; growth hormone gene; aquaculture; primary pituitary cell

**Abstract:** This study aimed to investigate the effect of vitamin E on expression of the growth hormone gene *gh* in pituitary tissues of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). DL-alpha-tocopherol acetate was added to the basic diet (vitamin E) at concentrations of 0, 400, and 1600 mg/kg diet to feed ( $464 \pm 2.6$ ) g semi-smooth tongue sole for 8 weeks. In addition, 0, 18, and 54  $\mu\text{mol/L}$  vitamin E were added to L-15 medium for primary pituitary cell culture for 3 d. The expression of *gh* in pituitary tissues and primary pituitary cells was analyzed by real-time quantitative PCR. The results showed that in the *in vivo* experiment, *gh* mRNA expression significantly ( $P < 0.05$ ) increased when dietary vitamin E increased from 0 to 400 mg/kg and then significantly decreased in the group that received 1600 mg/kg ( $P < 0.05$ ). In the *in vitro* experiment, the expression level of *gh* increased significantly with increasing vitamin E concentration ( $P < 0.05$ ). Therefore, the proper concentration of vitamin E could promote the expression of *gh* in the pituitary tissue of half-smooth tongue sole.

(本文编辑: 谭雪静)