

综述

鱼类生长激素的分子生物学 和应用研究的进展*

徐斌 张培军[†] 李德尚

(青岛海洋大学国家教委水产养殖开放研究实验室, 青岛 266003)

[†](中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 依据1985—1995年国际有关资料对鱼类生长激素的分子生物学及其应用研究的最新成果与进展进行综合评述。研究表明, 已完成鳊鲌等9种鱼类生长激素的氨基酸组成与全序列分析及大麻哈鱼等20种鱼类的生长激素基因的分离与克隆, 有些已在工程菌或动物细胞中高效表达; 鱼类生长激素基因的调控机制与生长激素的活性部位研究正在深入进行; 将外源的生长激素引入鱼体或将外源的生长激素基因导入受体鱼, 以期促进生长、增加抗性, 是生长激素应用于水产养殖研究的主要方向。

关键词 鱼类 生长激素 分子生物学 基因 应用 进展

鱼类生长激素的分子生物学研究使人类能够从分子水平上深入认识鱼类生长激素的组成、结构、功能、基因调控及其进化分类意义等。如何更好地发挥鱼类内源生长激素的生理作用或将外源生长激素(或基因)引入鱼体, 以促进生长、提高抗性, 已成为当前鱼类生长激素应用于水产养殖研究的重大课题。为此, 本文就本领域1985—1995年来国际上的重要研究成果和今后的研究方向予以评述, 以期为我国鱼类增养殖研究提供参考。

1 分子生物学研究的主要进展

1.1 鱼类生长激素的氨基酸组成与序列分析方面的进展

鱼类生长激素(GH)的结构分析工作是在现代生物化学对GH的分离纯化技术不断提高的基础上进行的。日前, 已经完成了鳊鲌、银大麻哈鱼、虹鳟、蓝鲨、狐鲣、大西洋鲑、斑点叉尾鲌、白鲟和牙鲆等GH的氨基酸全序列分析和鉴定, 证实鱼类GH在分子量、氨基酸组成及序列等方面与其他脊椎动物GH有一定的同源性, 分子量约为22 000道尔顿(Da), 为含173—190个氨基酸(aa)残基组成的单链多肽, 一级结构中含两个二硫键。在对鱼类GH进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离分析的同时, 发现数种鱼类存在两种GH形态, 如Kawauchi等(1986)发现两种大麻哈鱼GH分子, GH-I和GH-II, 二者的分子量都为22 000Da, 等电点分别为5.6和6.0, 且具有不同的氨基酸组成和N-末

*国家自然科学基金资助项目, 39470553号。徐斌, 男, 出生于1963年11月, 博士, 副教授。

段存明博士(美国北卡罗来纳大学)多年来在鱼类内分泌学方面给予热心帮助和指导, 并提供大量鱼类GH方面的参考文献; 孙玉贤博士(新西兰林肯大学动物科学系)提供许多哺乳类GH方面的参考文献, 均此一并志谢。

收稿日期: 1995年8月30日, 接受日期: 1996年4月5日。

端(N-T)残基,推测可能存在两种编码基因。随后,在鳗鲡、大西洋鲑、海鲈和白鲟等鱼中也发现有两种形式的GH-I和II的存在。硬骨鱼类的GH-I和II结构无糖基化存在。鲑科鱼类存在天然的四倍体鱼(Ohno, et al., 1968);可能引起鱼类GH的多样性。

1.2 鱼类生长激素基因的分离、克隆、表达与序列分析

目前,鱼类GH研究逐渐深入至分子水平。已有大麻哈鱼、虹鳟、银大麻哈鱼、鳗鲡、金枪鱼、大鳞大麻哈鱼、罗非鱼、鲤、牙鲆、真鲷、草鱼、大西洋鲑、白斑狗鱼、大甲鲇、金头鲷、黄鳍鲷、斑点叉尾鲷、红大麻哈鱼、鲟和马苏大麻哈鱼等的重组GH cDNA被分离与克隆;其中鳗鲡、罗非鱼、金枪鱼、真鲷、大鳞大麻哈鱼、虹鳟和黄鳍鲷等鱼的GH,已在工程菌或动物细胞中高效表达,且与提纯的天然GH有同样的生物活性,由于它们成本低,可大量获得,为应用于水产养殖提供了前提。

鱼类GH cDNA的克隆及序列分析,为人们深入研究鱼类GH的结构和功能奠定了基础。现已证明,虹鳟、大麻哈鱼和大西洋鲑均含有两种形态的GH基因,并分别编码两种蛋白质,这可能由于多数鲑科鱼类在自然界都是四倍体,而反映出其遗传基因的多态性。另外,虹鳟、大西洋鲑和大鳞大麻哈鱼GH,含6个外显子和5个内含子,其基因组DNA长度为4.5—5kb;而鲤、斑点叉尾鲷和草鱼GH则与哺乳类GH相同,含5个外显子,4个内含子,相应基因组DNA小于3.5kb;然而,尽管罗非鱼GH基因组DNA为3.5kb,但却含6个外显子和5个内含子(Zhu et al., 1992; Chen et al., 1994)。通常,鱼类GH基因5'端上游启动序列第21—24位核苷酸,均含TATA框保守序列,而3'端均含有poly(A);鲑科鱼类poly(A)序列为AATAAA,而鲤则为ATTAAA(Male et al., 1992; Ber et al., 1992),至于这些结构上的特点与功能的相互关系有待今后进一步阐明。对鱼类GH及其基因的序列分析还表明,GH与催乳素(PRL)、胎盘催乳素(PL)及生长催乳素(SL)在结构上有很高的同源性,推测它们起源于共同的基因祖先(家族),因此,称之为GH/PRL家族激素。同科的草鱼和鲤GH基因外显子的同源性为84.1%—93.2%;而草鱼与不同目的虹鳟为43.5%—82.1%,草鱼与哺乳类鼠只有45.8%—58.6%(Zhu et al., 1992);白鲟与四足类(海龟,鸡等)GH之间的同源性却高达63%—76%,与其它鱼类之间仅有42%—64%,说明白鲟与四足类GH起源于共同的祖先(Yasuda et al., 1992)。因此,GH的序列结构具有高度的进化分类意义,可据其同源性高低,画出脊椎动物GH分子的系统进化树,并由此决定不同脊椎动物GH的系统进化地位。另外,由鳗鲡与鲟的GH含有与哺乳类GH相似的氨基酸数目(190)和较高的同源性,推测脊椎动物GH在进化过程中具有共同的祖先;GH分子序列的多样性,可能是通过基因复制过程中的突变和删除作用进化而来。

1.3 鱼类GH基因的调控机制与生长激素的活性部位研究

目前,甲状腺素和糖皮质激素对硬骨鱼类GH基因的表达调控作用知之甚少。Yada等(1991)证明,无血清离体培养的虹鳟垂体,8d内其每个GH细胞GH mRNA的水平不变;另外,从对罗非鱼GH基因结构分析证明,不存在类似于哺乳类的糖皮质激素或甲状腺素-受体复合物的DNA结合位点(Ber et al., 1992)。可见鱼类GH基因的表达机制可能不需甲状腺素和糖皮质激素的调控,而是通过下丘脑吻端的氨基酸和多肽神经生成纤维直接分布于GH细胞来调控;也可能存在旁分泌和自主分泌调控形式;当然也不排

除类似于哺乳类的细胞间或细胞内转移因子的调控作用的存在 (Nelson et al., 1988; Ingraham et al., 1988)。

关于 GH 分子结构与活性部位的研究一向是 GH 分子生物学研究的热点。Watahiki 等 (1989) 从牙鲆 GH cDNA 序列推导出其 GH 序列, 证明其成熟的 GH 是迄今最小的 GH; 含 171—173 个 aa 残基, 分子量为 19 400—19 700Da; 含 37 个保守的 aa 残基, 分布于 GD1—GD5 五个结构域中。通过对猪 GH 的单晶 X—衍射分析 (Abdel—Meguid et al., 1987) 证实, GD1—GD4 分布于 GH 分子的外部, 主要决定与受体结合的性质, 而 GD5 位于内部, 决定分子的构象。迄今, 鱼类 GH 活性部位尚未见报道, 推测, 不同脊椎动物其 GH 活性中心在 GH 链中的位置和长短有包容性, 但各不相同, 其功能也存在差异 (Hara et al., 1978; Nicoll et al., 1986)。

2 鱼类生长激素在水产养殖中的应用与展望

2.1 优化养殖的环境因子与营养条件, 有利于鱼类 GH 的正常分泌

目前, 人们对鱼类 GH 的产生、基本生理功能、代谢动力学与分泌调控及其作用机制有了比较全面的认识, 为 GH 更好地应用于水产养殖奠定了基础。在进行鱼类养殖过程中, 不但要控制鱼类养殖的生态条件, 选择适宜的水温、光照(期)、养殖密度(DO 条件)和水流速条件, 使养殖鱼类能正常地分泌足够的 GH, 避免不必要的应激反应, 满足其生长发育的需要; 还要使养殖鱼类处于优化的营养条件下, 根据鱼种的不同生长期, 选择合适的投饵率, 并保证饵料中蛋白质、氨基酸、脂肪、碳水化合物等营养成分的合理搭配, 以利于养殖鱼类 GH、胰岛素样生长因子—I(IGF—I)对蛋白质、氨基酸等的代谢需求, 充分发挥其促生长的生物活性。此外, 养殖鱼类第一次性成熟前, 体内 GH 水平较高, 生长速度快, 是商品鱼养殖的关键时期, 优化此间的养殖条件无疑是鱼类养殖成败的关键。迄今, 对重要经济养殖鱼类 GH 分泌与环境因子或营养条件的关系知之甚少, 今后, 此类关系的阐明对鱼类养殖的发展是至关重要的。

2.2 外源生长激素在水产养殖中的应用

外源 GH 对多种鱼类的生长有明显的促进作用; 基因工程技术使重组鱼类 GH 在工程菌中大量表达生产成为现实, 且重组 GH 与天然 GH 有相同的生物活性, 引入鱼体不会产生积累, 不影响鱼体的组成成分。这些研究成果预示着将外源 GH 用于鱼类养殖生产的时期已经到来。尽管, 人们采用过将 GH 肌肉或腹腔注射、埋植含 GH 的胆固醇片、埋植含 GH 的微渗透泵和浸泡处理法给入鱼体, 均能促进鱼类的生长, 但是可长期使用而不对养殖鱼类产生应激或伤口感染的方法, 当推将 GH 加入饵料口服法。Moriyama 等 (1993) 在将外源 GH 与保护剂结合, 免受鱼胃或前肠对 GH 的分解, 提高口服 GH 的效果方面, 取得了可喜的进展。此外, 在仔稚鱼阶段, 一次或多次浸泡处理法也是实际可行的途径。

用鱼类 GH 预处理, 还可提高鲑科幼鱼在海水中的成活率, 降低入海的放养规格。鱼类 GH 对某些贝类(鲍和牡蛎)幼体也有明显的促进生长发育的作用 (Paynter et al., 1990)。此外, GH 对提高鱼类免疫力和抗病力方面的研究正在进行。

2.3 转生长激素基因鱼类在水产养殖中的应用

1985 年, Zhu 等首先将外源人 GH(hGH) 基因采用显微注射法导入金鱼受精卵中,

使其整合并表达 hGH。之后, Du 等(1992)将全鱼生长激素基因导入大西洋鲑, 成功地获得比对照大 4—6 倍的快速生长的转基因鱼。Devlin 等(1994)将红大麻哈鱼的全鱼 GH 基因导入银大麻哈鱼, 取得了转基因鱼比对照组鱼生长快 11 倍的结果; Tsai 等(1995)、Xu 等(1995)采用精子携带或电脉冲法将全鱼 GH 基因分别导入泥鳅和牙鲆中, 也获得了比对照组生长快 2.5 倍的转基因鱼。尽管转基因鱼研究的许多基础问题(如定点整合、导入效率低、整合表达的随机性和不稳定性等)尚待解决, 但是, 通过将外源快速生长的 GH 基因导入受体鱼, 使之在受体鱼中表达, 能够达到使养殖鱼类快速生长的目的; 特别是全鱼基因元件(由鱼类自身高效表达的启动子和鱼类 GH 基因构成)的使用, 既可提高表达效率, 又可消除哺乳类 GH 引入鱼体对消费者产生的食用疑虑。无疑, 转 GH 基因鱼研究在理论和方法上的最终突破, 对缩短主要经济鱼类的养殖周期, 提高产量和效益, 乃至对整个水产养殖业的发展将产生深刻的变革。

3 结语

鱼类 GH 研究不仅具有重要的理论意义, 而且具有重大的应用价值。今后首先要从理论上加强鱼类 GH 分子内分泌学及转 GH 基因鱼类的基础研究, 阐明我国主要经济鱼类生长发育过程中体内 GH 的变化规律, 同时开展基因工程重组鱼 GH 的生产及其在水产养殖中的应用, 这将对改变我国海水鱼类养殖的落后面貌, 培育出生长快、抗性强的优质养殖鱼类或快速生长的转基因鱼新品种, 缩短商品鱼养殖周期, 提高鱼产量, 为人们提供更多的优质鱼类蛋白做出有益的贡献。

参 考 文 献

- Abdel - Meguid, S. S. et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**: 6, 434—6, 437.
- Ber, R. et al. 1992, *Gene.*, **113**:245—250.
- Chen, T. T. et al., 1994, *Perspectives in Comparative Endocrinology*, ed. by Davey, K. G., National Research Council (Ottawa), pp. 352—364.
- Devlin, R. H. et al., 1994, *Nature*, **371**(6 494):209—210.
- Du, S. et al., 1992, *Biotechnology*, **10**:176—181.
- Hara, K. et al., 1978, *Biochemistry*, **17**: 550—556.
- Ingraham, H. A. et al., 1988, *Cell*, **55**: 519—529.
- Kawauchi, H. et al., 1986, *Arch. Biochem. Biophys.*, **244**: 542—552.
- Male, R. et al., 1992, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1130**:345—348.
- Moriyama, S. et al., 1993, *Aquaculture*, **112**:99—106.
- Nelson, C. et al., 1988, *Science*, **239**: 1400—1405.
- Nicoll, C. S. et al., 1986, *Endocr. Rev.*, **7**: 169—203.
- Ohno, S. et al., 1968, *Hereditas*, **5**: 169—187.
- Paynter K. T., et al., 1990, *J. Shellfish Res.*, **8**: 477—478.
- Tsai, H. J. et al., 1995, *Can. J. Aquat. Sci.*, **52**(4): 776—787.
- Watahiki, M. et al., 1989, *Bio. Chem.*, **264**(1): 312—316.
- Xu, B. et al., 1995, *Proceeding of Fourth Asian Fisheries Forum*, Edited and Published by Editorial Committee of Journal of Fisheries of China (Shanghai), p.80.
- Yada, T. et al., 1991, *Endocrinology*, **129**(3):1 183—1 192.
- Yasuda, A. et al., 1992, *Biochimica of Biophysica. Acta.*, **1120**:297—304.

Zhu, Z. et al., 1985, *Z. Angew. Ichthyol.*, 1:31—34.

Zhu Z. et al., 1992, *Eur. J. Biochem.*, 207(2):643—648.



Review

ADVANCES IN STUDIES ON MOLECULAR BIOLOGY AND APPLICATIONS OF FISH GROWTH HORMONE

Xu Bin, † Zhang Peijun, Li Deshang

(Open Laboratory on Aquacultural Research of the State Educational Committee of China,
Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003)

† (Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

Abstract Based on 1985—1995 published data, this paper reviews the advances and latest results in studies on molecular biology and applications of fish growth hormone (GH). Recently, the amino acid compositions and complete amino acid sequences of 9 fish GHs, such as those of eel, etc., were determined. About 20 fish GH genes, including chum salmon, etc., have been isolated and cloned, and some have been expressed in engineering bacterium, yeast and animal cells. Studies on the regulatory mechanism (s) of fish GH genes and bioactive domains in fish GH are being intensively carried out. In order to promote growth and increase disease resistance, the exogenous GH and GH genes are delivered and transferred to farmed fish.

Key words Fish Growth hormone (GH) Molecular biology Gene Application Advances