

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)GnRHR 基因全长 cDNA 的克隆与组织表达分析*

李风铃 王清印 李兆新 翟毓秀 郭萌萌

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 采用同源克隆和末端快速扩增(RACE)方法,克隆了半滑舌鳎中 GnRHR 全长 cDNA。通过基因全长以及推断的氨基酸序列分析,得知该序列包含一个 7tm-1 保守结构域,为 G 蛋白偶联受体家族成员。利用 PHYLIP 3.5c 邻位相连法以及 DNASTAR 中的 CLUSTAL W 方法对相应的氨基酸序列进行了聚类分析和序列相似性分析。结果表明,半滑舌鳎 GnRHR 与鲈鱼、琥珀鱼、虹鳟以及青鳉等鱼类中的 GnRHR 聚为一支,亲缘关系较近,且相似性较高,分别为 90.1%、89.7%、79.0%以及 78.3%,而与高等哺乳动物人、小鼠相似性仅分别为 18.8%和 16.2%,亲缘关系较远。应用半定量 RT-PCR 技术分析其组织表达,发现 GnRHR 广泛表达于各个组织,但表达量差异较大,在性腺、脑和肾中表达量较高,其它组织较弱。

关键词 半滑舌鳎, GnRHR, 克隆, 组织特异性表达

中图分类号 Q75

促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)是由下丘脑合成的十肽激素,通过刺激垂体前叶释放促性腺激素(gonadotropin, GtH),控制卵泡刺激素(FSH)和黄体生成素(LH)的释放,在硬骨鱼类中,对脑和垂体激素的释放与合成具有重要的平衡调节作用,为下丘脑-垂体-性腺(hypothalamic-pituitary-gonadal, HPG)轴的关键调节因子。因而,众多的内分泌学家和生殖生物学家围绕着 GnRH 的结构与功能展开了研究(Chandran *et al*, 1999; Dubois *et al*, 2002; Amano *et al*, 2002; Somoza *et al*, 2002)。研究发现,鱼类脑组织中的 GnRH 一般具有 3 种类型,分别被命名为 Ⅰ型、Ⅱ型和 Ⅲ型,且可能并存于同一物种的大脑中,主要分布在端脑、下丘脑和视前区(房保海等, 2006; Dubois *et al*, 2002; Lethimonier *et al*, 2004)。不同类型的 GnRH 功能有所不同,其中, Ⅰ型促使脑垂体合成和释放 GtH; Ⅱ型起神经递质作用,

间接参与生殖活动的调节; Ⅲ型的功能尚不清楚(Lin *et al*, 1998b; Steven *et al*, 2003; 叶丹等, 2003; 黎双飞等, 2004; 丁福红等, 2010)。

GnRH 在 HPG 轴中具有非常重要的作用,主要是由于在信号传导过程中与其受体(GnRHR, 促性腺激素释放激素受体)的结合作用。GnRHR 是一种特异性膜受体,在多数组织器官中均有表达,不仅限于 HPG 轴相关的组织或者器官(Moncaut *et al*, 2005; Han *et al*, 1998)。GnRH 往往通过 G 蛋白偶联受体的作用、以高度的亲和力与位于垂体前叶的促性腺激素分泌细胞膜上的 GnRHR 受体相结合,激活腺苷酸环化酶-cAMP-蛋白激酶体系,以促进 LH 和 FSH 的合成和释放(Yao *et al*, 1999; Lin *et al*, 1998a)。在硬骨鱼类中, GnRHR 可分为 GnRHR1 和 GnRHR2 两种类型(Moncaut *et al*, 2005),而根据 Kah 等(2007)的建议,则将除哺乳动物之外的其它所有物种的 GnRHR 都归

* 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金, 2060302 号。李风铃, 助理研究员, E-mail: milyandtt@163.com

通讯作者: 王清印, 研究员, 博士生导师, E-mail: qywang@public.qd.sd.cn

收稿日期: 2010-10-23, 收修改稿日期: 2010-12-26

为 GnRHR2。目前已有研究表明, GnRHR 在生长发育过程中具有重要的调节作用, 并且雌二醇等物质对其在 mRNA 和蛋白水平上的表达模式具有较大影响。因此, 这也证明了 GnRHR 在生物体内分泌系统中具有一定的调节功能(Crowder *et al.*, 1984; Gregg *et al.*, 1990)。然而, 关于 GnRHR 的功能及表达方面的研究仍相对较少, 尤其海水鱼类中的工作亟待开展。

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)属于鲽形目、舌鲷科、舌鲷属、三线舌鲷亚属, 俗称牛舌头、鲷目、鲷米等, 主要分布于朝鲜、中国、日本近海以及俄罗斯远东海域, 为常见的暖温性近海大型底层鱼类(周勇等, 2009)。该鱼生长快, 肉味鲜美, 营养丰富, 具有较高的经济价值, 素有“贵族鱼”之称。另外, 由于它具有广温、广盐和适应多变的环境条件的特点, 深受养殖用户的青睐。目前, 还未见半滑舌鲷中促性腺激素释放激素基因的相关报道, 本课题组从半滑舌鲷脑组织中克隆和鉴定了 GnRH 基因, 对其组织表达模式进行了分析, 为进一步了解 GnRH 基因的功能及作用机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)购自山东海阳市海珍品养殖场, 平均体重约 800g, 观察体表健康无病。活体运回实验室后, 于室温和自然光周期下暂养一周, 缸内连续充气。将半滑舌鲷精巢、鳃、皮肤、肠、胸腺、肝脏、心脏、肾脏、脾脏等 9 种组织取出, 迅速放入液氮中冻存, 然后转入 -80°C 冰箱保存备用。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

按 50—100mg 半滑舌鲷组织/每 ml Trizol (Invitrogen, USA)的比例, 向液氮低温研磨的各个组织中加入 Trizol 试剂, 利用 Trizol 一步法提取总 RNA。利用 M-MLV 反转录酶(Promega)合成 cDNA; 利用 BD SmartTM RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech)合成 RACE-Ready-cDNA, 于 -20°C 冰箱保存备用。

1.3 半滑舌鲷 GnRHR 基因的克隆

通过 RT-PCR 反应获得半滑舌鲷 GnRHR 基因的保守片段, 反应条件为 94°C 30s、 55.6°C 30s、 72°C 60s, 30 个循环, 最后 72°C 延伸 10min。

RACE-PCR 扩增按照 SmartTM RACE cDNA 扩增试剂盒的说明书进行。RACE PCR 反应条件: 94°C

5 min、 94°C 1 min、 69°C 50s、 72°C 1min, 共 5 个循环, 接下来 94°C 30s、 64°C 30s、 72°C 3min, 共 30 个循环, 72°C 延伸 10min。

上述 PCR 反应均以半滑舌鲷脑为模板。PCR 反应结束后, 各 PCR 反应产物以 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 从凝胶中纯化回收目的产物。将纯化的 PCR 产物克隆到 pMD-18T 载体中, 转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞, 挑取阳性克隆, 于上海生物工程有限公司进行测序。试验中所涉及的引物见表 1。

表 1 实验所用引物及其序列
Tab.1 Sequences of the primers used for the PCR analysis

引物名称	引物序列(5'—3')
TsGn-S	5'-CTGCAACCTKGCWGTGCTGT-3'
TsGn-A	5'-GTGAATGGTGAACAGGCCGTAGAT-3'
TsGnP3	5'-CTGGTCAACGCCTGTCTGGA-3'
TsGnP5	5'-CGGATCGATGTCGGTCATTGA-3'
UPM	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
NUP	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
GnRTF	5'-ATCACGGTTCAGTGGTTGGCTG-3'
GnRTR	5'-CGACTGTCTGTCCAGGCTGATG-3'
β -actinF	5'-CTCCGGTATGTGCAAGGC-3'
β -actinR	5'-GCTGGG CTGTTGAAGGTC-3'

1.4 序列分析

测序结果用 BLAST 软件(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)进行同源性分析, 分析该扩增结果与其它物种的 GnRH 基因同源性高低; 利用 PHYLIP 3.5c 邻位相连法构建系统进化树, 分析不同物种之间亲缘关系的远近。

1.5 表达研究

利用半定量 RT-PCR 以及 QRT-PCR 技术, 检测半滑舌鲷 GnRHR 基因在精巢、卵巢、头肾、心脏、脾脏、肝脏、肠、脑、鳃、肌肉等组织和器官中的表达情况。总 RNA 的提取及 cDNA 的合成方法见 1.2。以各 cDNA 为模板, 用引物 β -actinF 和 β -actinR 扩增的 actin 基因片段作为内参, 调整各样品模板浓度。然后用 GnRTF 和 GnRTR 一对特异性引物对 GnRHR 在各组织中的表达情况进行检测。

2 结果

2.1 GnRHR 的序列分析

将 RT-PCR 及 RACE 得到的测序结果进行序列拼接, 得到一个编码 340 个氨基酸的 cDNA 序列, 其开

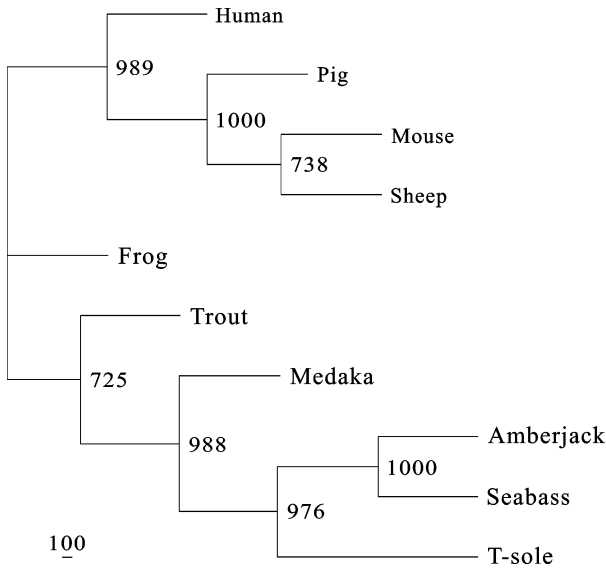


图2 基于 PHYLIP 3.5c 邻位相连法的半滑舌鳎 GnRHR 和其它物种的分子进化树

Fig.2 The rooted phylogenetic tree of the GnRHR and other representative sequences constructed by the neighbor-joining method using the package PHYLIP 3.5c

3 讨论

本实验中以海水鱼半滑舌鳎为研究材料, 采用同源克隆的方法, 从半滑舌鳎脑中获得了 GnRHR cDNA 全长。通过核苷酸以及推断的氨基酸序列分析, 可以发现半滑舌鳎 GnRHR 在结构上与其它物种的 GnRHR 具有很高的保守性, 均具有 G 蛋白偶联受体特有的保守结构域 7tm-1, 因此, 可初步推断克隆得到的序列为半滑舌鳎 GnRHR 基因。

利用该序列编码的氨基酸序列与已经证实的脊椎动物中 GnRHR 氨基酸序列构建系统进化树, 分析结果表明, 半滑舌鳎 GnRHR 与鱼类中的 GnRHR 聚成一簇, 显示了在长期的物种进化过程中, 它们具有较近的亲缘关系。当进一步对上述物种的 GnRHR 氨基酸序列进行相似度分析时, 结果同样表明半滑舌鳎 GnRHR 与鲈鱼、琥珀鱼、虹鳟以及青鳉的相似度较高, 分别是 90.1%、89.7%、79.0%以及 78.3%, 这进一步支持了以上结论。

表2 半滑舌鳎和其它物种 GnRHR 氨基酸序列的同源性分析

Tab.2 Homology analysis of the GnRHR amino acid sequences between *C. semilaevis* and other vertebrates

种类	琥珀鱼	人	青鳉	小鼠	猪	虹鳟	羊	鲈鱼	舌鳎	爪蟾
琥珀鱼	—	14.5	62.3	31.8	32.3	66	32.3	84	89.7	60
人		—	16.1	17.4	14.9	17.1	19.2	17.9	18.8	16.4
青鳉			—	14.1	13.7	10.9	15.9	64.6	78.3	59.5
小鼠				—	85.9	20.5	87.5	16.5	16.2	17.1
猪					—	19.8	85.4	17.4	15.1	16.5
虹鳟						—	20.1	66.3	79	14.7
羊							—	16.2	16.5	19.2
鲈鱼								—	90.1	60.2
舌鳎									—	66.5
爪蟾										—

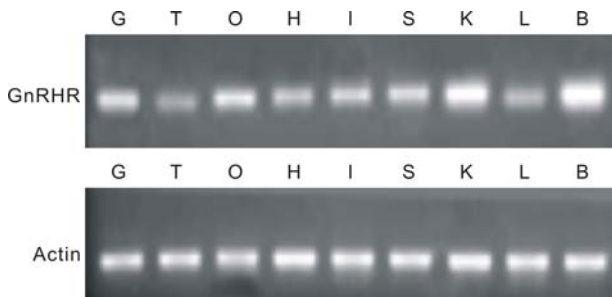


图3 半滑舌鳎 GnRHR 基因的组织表达特异性 RT-PCR 分析

Fig.3 Semi-quantitative RT-PCR analysis of GnRHR gene in different tissues of *C. semilaevis*

注: G: 鳃; T: 精巢; O: 卵巢; H: 心脏; I: 肠; S: 脾; K: 肾; L: 肝脏; B: 大脑

目前, 已有研究表明, GnRHR 的表达模式在不同物种中具有一定差异, 但在大多组织中均具有不同程度的表达。在几种鱼类中的相关研究同样证明了这一点(Lethimonier *et al*, 2004; Moncaut *et al*, 2005, Kah *et al*, 2007)。就硬骨鱼类而言, 对 GnRHR 开展的最早研究是在金鱼中, 研究发现, 金鱼存在不同的 GnRHR 类型, 并且展示了不同的组织表达模式以及病理学特征(Illing *et al*, 1999)。有学者推测, 基于 GnRHR 为胞内受体, GnRH 肽聚糖可能与某些器官中的细胞增殖和凋亡有关(Kah *et al*, 2007)。Lin 等(1998b)也描述了当将鳃鱼 GnRHR 的胞内 C 末端连接到小鼠的 GnRHR 时, 可影响小鼠 GnRHR 的表达和功能活性。

方之平等(2004a, b)也证明了在黄颡鱼的神经系统、垂体和性腺中存在 GnRHR 免疫反应阳性细胞, 并且性成熟后阳性细胞数量明显增多。这表明黄颡鱼 GnRH 的功能可能类似于高等哺乳动物, 与垂体中 GtH 细胞膜上的 GnRHR 高亲和力特异性结合, 刺激 GtH 的合成与释放, 进而通过血液循环调节性腺类固醇激素的产生和配子发生(方之平等, 2004a, b)。本实验发现, GnRHR 在半滑舌鳎大多组织中均有表达, 其中, 在性腺、脑以及肾中表达最强, 这与前人的研究结果是一致的, 至于其功能方面的活性是否类似于以上物种, 尚需要进一步的研究工作。

总之, 目前对于鱼类 GnRHR 表达和功能研究仍涉及较少, 鉴于其在内分泌系统调节中的重要作用, 下一步应加大研究力度, 这对于进一步了解水生生物生殖调控机制以及探索人工繁殖技术具有深远意义。

参 考 文 献

- 丁福红, Santosh P Lall, 李 军等, 2010. 大西洋庸鲽 (*Hippoglossus hippoglossus* L.) 精液脂肪酸分析及激素 GnRH α 诱导对其组成的影响. 海洋与湖沼, 41(6): 857—861
- 方之平, 潘黔生, 2004a. GnRH 及其受体在 2 种真骨鱼消化系统中存在的免疫细胞化学证据. 水产学报, 28(3): 261—266
- 方之平, 潘黔生, 罗立廷等, 2004b. GnRH 及其受体在性成熟前后鲇、黄颡鱼脑、垂体和卵巢中的免疫细胞化学定位. 水生生物学报, 28(1): 63—68
- 叶 丹, 潘建伟, 廖鸣娟等, 2003. 促性腺激素释放激素的结构及其生物学功能. 生物化学与生物物理进展, 30(1): 49—54
- 周 勇, 马绍赛, 曲克明等, 2009. 悬浮物对半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 幼鱼肝脏溶菌酶、超氧化物歧化酶和鳃丝 Na⁺-K⁺-ATPase 活性的影响. 海洋与湖沼, 40(3): 367—372
- 房保海, 孙修勤, 曲凌云等, 2006. 牙鲆促性腺激素释放激素基因 cGnRH-II 和 sbGnRH 的克隆与表达特征分析. 高技术通讯, 16(5): 529—533
- 黎双飞, 胡 炜, 汪亚平等, 2004. 鲤鱼两个 cGnRH-II 基因的发现及其在成熟个体的表达分析. 中国科学 C 辑(生命科学), 34(1): 88—95
- Amano M, Takahashi A, Yamanome T *et al*, 2002. Molecular cloning of three cDNAs encoding different GnRHs in the brain of barfin flounder. Gen Comp Endocrinol, 126(3): 325—333
- Chandran U R, DeFranco D B, 1999. Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene transcription. Behav Brain Res, 105(1): 29—36
- Crowder M E, Nett T M, 1984. Pituitary content of gonadotropins and receptors for gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and hypothalamic content of GnRH during the periovulatory period of the ewe. Endocrinology, 114: 234—239
- Dubois E A, Zandbergen M A, Peute J *et al*, 2002. Evolutionary development of three gonadotropin-releasing hormone (GnRH) systems in vertebrates. Brain Res Bull, 57(3—4): 413—418
- Gregg D W, Allen M C, Nett T M, 1990. Estradiol-induced increase in number of gonadotropin-releasing hormone receptors in cultured ovine pituitary cells. Biol Reprod, 43: 1032—1036
- Han X B, Cao Y Q, Zhuang L Z, 1998. GnRH receptor and the regulation of its gene expression. Advance of Physiologic Science, 29(3): 198—202
- Illing N, Troskie B E, Nahorniak C S *et al*, 1999. Two gonadotropin-releasing hormone receptor subtypes with distinct ligand selectivity and differential distribution in brain and pituitary in the goldfish (*Carassius auratus*). Proc Natl Acad Sci U S A, 96(5): 2526—2531
- Kah O, Lethimonier C, Somoza G *et al*, 2007. GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. Gen Comp Endocrinol, 153: 346—364
- Lethimonier C, Madigou T, Muñoz-Cuet J A *et al*, 2004. Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. Gen Comp Endocrinol, 135: 1—16
- Lin X W, Otto Carla J, Peter R E, 1998a. Evolution of neuroendocrine peptide systems: Gonadotropin-releasing hormone and somatostatin. Comparative Biochemistry and Physiology C, 119: 375—388
- Lin X, Janovick J A, Brothers S *et al*, 1998b. Addition of catfish gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor intracellular carboxyl-terminal tail to rat GnRH receptor alters receptor expression and regulation. Mol Endocrinol, 12: 161—171
- Moncaut N, Somoza G, Power D M *et al*, 2005. Five gonadotropin-releasing hormone receptors in a teleost fish: isolation, tissue distribution and phylogenetic relationships. J Mol Endocrinol, 34: 767—779
- Somoza G M, Miranda L A, Strobl-Mazzulla P *et al*, 2002. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH): from fish to mammalian brains. Cell Mol Neurobiol, 22(5—6): 589—609
- Steven C, Lehnen N, Kight K *et al*, 2003. Molecular characterization of the GnRH system in zebrafish (*Danio rerio*): cloning of chicken GnRH-II, adult brain expression patterns and pituitary content of salmon GnRH and chicken GnRH-II. Gen Comp Endocrinol, 133(1): 27—37
- Yao B, Huang W Q, Sun L, 1999. Immunohistochemical study of gonadotropin releasing hormone receptor in rat digestive tract. Acta Anatomica Sinica, 30(2): 152—154

**FULL LENGTH cDNA CLONING AND TISSUE EXPRESSION OF
GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE RECEPTOR (GnRHR) OF HALF SMOOTH
TONGUE SOLE *CYNOGLOSSUS SEMILAEVIS***

LI Feng-Ling, WANG Qing-Yin, LI Zhao-Xin, ZHAI Yu-Xiu, GUO Meng-Meng
(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract Full-length cDNA encoding GnRHR was cloned from half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* by homology cloning and RACE PCR approach. According to the full length of the cDNA and deduced amino acid sequence, a 7tm-1 conservative domain was found and the cDNA was proved to be one of the G protein-coupled transmembrane family members. The rooted phylogenetic tree, analysis of identity of GnRHR, and other representative sequences were constructed by the neighbor-joining method within the package PHYLIP 3.5c and CLUSTAL W method, respectively. The results indicated that the GnRHR of the tongue sole was clustered together with those of all other fish GnRHR, for example, the similarity was 90.1%, 89.7%, 79%, 78.3% when compared with striped sea bass, amberjack, trout, and medaka, respectively. In contrast, similarity between the GnRHR of the tongue sole and those of human and mouse was much lower (18.8% and 16.2%, respectively). Semi-quantitative RT-PCR analysis demonstrated that GnRHR was ubiquitously expressed in all tissues, although the expression level was not homogeneous. High levels of GnRHR transcript were detected in gonad, brain and kidney, and other tissues had lower levels.

Key words *Cynoglossus semilaevis*, GnRHR, Cloning, Tissue-specific expression