

# 密斑刺鲃(*Diodon hystrix*) *fsh $\beta$* 和 *lh $\beta$* 基因的克隆及表达分析\*

郭煜文 李奕凯 戴明姝 梁隽浩 黄彦霖 李广丽 陈华谱

(广东省名特优鱼类生殖调控与繁育工程技术研究中心 广东省海水养殖生物育种工程实验室 广东海洋大学水产学院 广东湛江 524088)

**摘要** 密斑刺鲃(*Diodon hystrix*)是南海名特优鱼类,同时具备食用和中药保健价值,但目前关于密斑刺鲃生殖生理的研究较少,影响了该鱼繁育理论研究的发展。众所周知,促性腺激素(Gonadotropic hormone, GtH)是生殖调控的关键激素之一,在生殖调控轴中发挥着承上启下的作用。利用转录组分析及分子克隆技术从密斑刺鲃中克隆并鉴定出 *fsh $\beta$*  和 *lh $\beta$*  基因的 cDNA 序列,通过生物信息学分析,发现密斑刺鲃 *fsh $\beta$*  cDNA 开放阅读框共 363 bp,编码 120 个氨基酸; *lh $\beta$*  cDNA 开放阅读框共 420 bp,编码 139 个氨基酸。通过序列比对和系统进化树分析,表明密斑刺鲃 Fsh $\beta$  和 Lh $\beta$  均与鲃科类的鱼的亲缘关系较近。利用三级结构分析,发现 Fsh $\beta$  的三级结构相对保守,而 Lh $\beta$  的三级结构差异较大。利用实时荧光定量的方法检测了密斑刺鲃 *fsh $\beta$*  和 *lh $\beta$*  基因的组织分布情况,结果表明密斑刺鲃 *fsh $\beta$*  和 *lh $\beta$*  在垂体的表达量最高,其次是性腺。此外,进一步检测了 *fsh $\beta$*  和 *lh $\beta$*  基因在雌雄性腺发育过程中的表达模式,发现垂体中 *fsh $\beta$*  基因伴随性腺的发育,表达量逐渐下降,而 *lh $\beta$*  基因的表达量呈逐渐增加模式。研究结果将为构建密斑刺鲃生殖调控网络提供研究基础。

**关键词** 密斑刺鲃; *fsh $\beta$* ; *lh $\beta$* ; 分子克隆; 表达模式

中图分类号 S965.3 doi: 10.11693/hyhz20230400098

在下丘脑-垂体-性腺(HPG)生殖调控轴中,垂体是中间节点,其分泌的促性腺激素(Gonadotropic hormone, GtH)是介导生殖调控的重要分子,并在生殖轴中起到承上启下的关键作用。促性腺激素,包括卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, Fsh)和黄体生成素(luteinizing hormone, Lh)。Fsh 和 Lh 均为异二聚体、非共价结合的糖蛋白,由一个相同的  $\alpha$  亚基和一个激素特异性  $\beta$  亚基组成。每个亚基都由独立的基因编码(Pierce *et al*, 1981; Fiddes *et al*, 1984)。在哺乳动物中, Fsh 和 Lh 由同一种促性腺激素细胞产生(Nakane, 1970),但在硬骨鱼类中, Fsh 和 Lh 主要存在于硬骨鱼脑垂体远侧部和中间部的不同的细胞群合成和分泌(Weltzien *et al*, 2003; Zhou *et al*, 2010),

这表明硬骨鱼类的 Fsh 和 Lh 具有不同的分泌调节机制和生理调控功能(Kim *et al*, 2005)。

目前, Fsh 和 Lh 已在欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)、日本鳗鲡(*A. japonica*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)和草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)等多种硬骨鱼类中克隆和鉴定,并开展了分子结构和表达分析(Chang *et al*, 1988, 1990; Degani *et al*, 2003; Kim *et al*, 2005; Jeng *et al*, 2007; Banerjee *et al*, 2008; Zhou *et al*, 2010)。Fsh 和 Lh 主要是受到来源于下丘脑神经元的促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)的刺激而合成与释放,释放后的 Fsh 和 Lh 分别与性腺中对应的受体 Fshr 和 Lhr 结合,然后促进性腺合成性类固醇激素,进而调节性腺的发育和成熟

\* 海南省重点研发计划, ZDYF2018225 号; 湛江市科技计划项目, 2022A01214 号; 阳江市科技计划项目, 2022011 号, SDZX2023027 号。郭煜文, 硕士研究生, E-mail: gdougyw@163.com

通信作者: 陈华谱, 博士, 教授, E-mail: chenhp@gdou.edu.cn

收稿日期: 2023-04-28, 收修改稿日期: 2023-08-04

(Weltzien *et al.*, 2004; 翟毅等, 2018)。研究表明, Fsh 和 Lh 在性腺发育调控过程中具有互补作用, 在生殖周期的不同阶段, *fshβ* 和 *lhβ* 在脑垂体中的表达存在明显差异。在裸盖鱼(*Anoplopoma fimbria*)的性腺发育过程中, *fshβ* 和 *lhβ* mRNA 在垂体中的表达逐渐增加, 并在成熟期中表达量最高(Guzmán *et al.*, 2018); 在美洲条纹狼鲈(*Morone saxatilis*)雌鱼卵巢发育早期, *fshβ* 和 *lhβ* 表达量同样逐步增加, 在卵黄生成后期, *fshβ* 的 mRNA 含量降低到基础水平, 但 GtHα 亚基和 *lhβ* mRNA 始终保持较高的表达水平(Hassin *et al.*, 1995); GtH 基因的表达特征是 *fshβ* 在配子发生的早期阶段表达量高, 并被认为作用于性腺早期的卵子发育和精子发生。另一方面, *lhβ* 在配子发生的早期阶段表达量低, 甚至检测不到, 但在性腺成熟阶段表达量达到最高, 并被认为主要作用于配子成熟(Kagawa *et al.*, 1998b)。

密斑刺鲃 *Diodon hystrix* (Linnaeus, 1758), 俗称斑点河鲃, 隶属于鲃形目(Tetraodontiformes), 刺鲃科(Diodontidae), 刺鲃属(*Diodon*), 主要分布在亚热带海域的潟湖和珊瑚礁中。当前关于密斑刺鲃生殖调控的相关研究较少, 只是涉及促性腺激素释放激素和性腺转录组分析等研究(陈华谱等, 2021; Chen *et al.*, 2021)。由此, 本研究旨在克隆密斑刺鲃 *fshβ* 和 *lhβ* 的 cDNA 序列并分析其结构特征, 研究密斑刺鲃 *fshβ* 和 *lhβ* 的表达模式, 为后续探究密斑刺鲃 Fsh 和 Lh 在生殖内分泌调控中的生理功能及构建完整的密斑刺鲃生殖调控轴提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用密斑刺鲃(*Diodon hystrix*)为海南省三亚市近海捕捞, 经 MS-222 麻醉剂(Sigma, 美国)麻醉后解剖, 取心脏、肝脏、脾脏、肾脏、垂体、脑、卵巢和精巢等组织, 经液氮速冻后保存于-80 °C 冰箱待用。

### 1.2 实验试剂

总 RNA 提取试剂盒 Trizol Reagent 和 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒(TaKaRa, 日本); 载体和感受态细胞 *pEASY-T3* Cloning Kit、2×EasyTaq® PCR SuperMix (+dye) 和 PerfectStart® Green qPCR SuperMix (全式金生物, 北京); 胶回收试剂盒和质粒提取(东盛生物, 广州); 其余化学试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.3 总 RNA 提取和 cDNA 的合成

将保存于-80 °C 的组织取出破碎匀浆, 使用 Trizol Reagent 试剂盒提取密斑刺鲃各组织总 RNA。RNA 完整性使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳验证。取 1 μg RNA 样品, 使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒反转录合成 cDNA。

### 1.4 *fshβ* 和 *lhβ* 基因的 cDNA 克隆

**1.4.1 引物设计** 利用同源比对的方法, 从密斑刺鲃转录组数据(NCBI: PRJNA674446)中进行在线 BLAST, 获取到密斑刺鲃 *fshβ* 和 *lhβ* 的基因序列, 并根据目的基因片段, 设计全长克隆和特异性引物(表 1)。

表 1 密斑刺鲃 *fshβ* 和 *lhβ* 基因克隆及组织分布的引物  
Tab.1 Primers for cloning and tissue distribution of *fshβ* and *lhβ* in *D. hystrix*

引物	序列(5'~3')	目的
<i>fshβ</i> -F1	ACAAGGTGTGTAACGGGGACTG	克隆
<i>fshβ</i> -R1	CCTTCAATGTGCTTCACTCGTA	
<i>lhβ</i> -F1	GTGCCGCTCTGTCAACTCGTC	克隆
<i>lhβ</i> -R1	CAAGTGCTACAACCTTCTCTCTCC	
<i>fshβ</i> -F2	GCTGGTTGTGATAATAGCAGTGTGTG	实时荧光定量
<i>fshβ</i> -R2	AGGAAGCGGCTGCAGTACATT	
<i>lhβ</i> -F2	GTGCCGCTCTGTCAACTCGTC	实时荧光定量
<i>lhβ</i> -R2	GGGGTAGGTGACAGTCGGGT	
<i>β-actin</i> -F	GAGAGGTTCCGTTGCCAGAG	内参基因
<i>β-actin</i> -R	CAGACAGCACAGTGTGGCGT	

**1.4.2 分子克隆** 以密斑刺鲃垂体组织的 cDNA 为模板, 结合 *fshβ* 和 *lhβ* 全长克隆引物, 按照前期研究的基因克隆方法进行密斑刺鲃 *lhβ* 和 *fshβ* 基因的克隆(陈华谱等, 2017)。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。将目的片段连接到 *pEASY-T3* 载体上, 转化至 *Trans1-T1* 感受态细胞, 筛选阳性结果送公司测序。

### 1.5 生物信息学分析

用 DNASTAR 7.1 软件预测密斑刺鲃 *fshβ* 和 *lhβ* 的开放阅读框并翻译为氨基酸序列, 进行同源性比对。运用在线网站 SignalP 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP>) 预测信号肽。运用在线网站 SoftBerry (<http://www.softberry.com/>) 预测蛋白质功能位点。运用 Mega 11.0 软件构建系统进化树。运用在线网站 Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/>) 进行蛋白质三级结构预测及分析。

### 1.6 *fshβ* 和 *lhβ* 基因的组织表达模式

将密斑刺鲃心脏、肝脏、脾脏、肾脏、垂体、脑、卵巢和精巢等组织的 cDNA 作为模板, 参照 PerfectStart®

Green qPCR SuperMix 试剂盒说明书准备反应体系, 利用 Roche LightCycler 480 (Roche, 瑞士) 检测 *fshβ* 和 *lhβ* 在各组织中的表达, 内参为  $\beta$ -actin 基因。qPCR 反应体系为 10  $\mu$ L : 5  $\mu$ L qPCR SuperMix, 0.4  $\mu$ L 上游引物, 0.4  $\mu$ L 下游引物, 1  $\mu$ L cDNA 模板, 3.2  $\mu$ L 无酶水。反应程序为: 首先 95  $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 57  $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 84  $^{\circ}$ C 收集荧光 10 s, 共 40 个循环; 溶解曲线: 95  $^{\circ}$ C 1 min, 52  $^{\circ}$ C 1 min, 95  $^{\circ}$ C 延伸。每个样品 3 次重复, 用  $R=2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算其相对表达量, 并使用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。

### 1.7 性腺发育过程中 *fshβ* 和 *lhβ* 基因在垂体中的表达模式

将密斑刺鲀麻醉后取其性腺及垂体组织, 依照 Chen 等(2020)石蜡切片方法对性腺进行切片观察和组织学分析, 鉴定其发育时期后将对应的垂体组织

进行归类。将垂体组织的 cDNA 作为模板, 实时荧光定量的方法与上述 1.6 相同, 每个样品 5 次重复, 检测不同性腺发育时期的垂体组织中 *fshβ* 和 *lhβ* 基因的相对表达量。

## 2 结果与分析

### 2.1 密斑刺鲀 *fshβ* 和 *lhβ* 基因 cDNA 克隆及序列分析

通过对克隆获得的序列进行分析, 发现密斑刺鲀 *fshβ* cDNA 开放阅读框共 363 bp, 编码 120 个氨基酸, 分子量(MW)为 13.17 kDa, 理论等电点(pI)为 6.01。其中 1~18 位氨基酸为信号肽, 19~120 位氨基酸为成熟肽, 成熟肽部分包含了 12 个保守的半胱氨酸残基, 19~117 位氨基酸为功能结构保守区糖蛋白激素  $\beta$  链同系物(glycoprotein hormone beta chain homologues, GHb)。此外, 在 *Fshβ* 氨基酸序列中含有一个 N-糖基化位点(图 1)。

```

1  ATG CAG CTG GTT GTG ATA ATA GCA GTG TTG GCG CTG GCG AGG ATG GGG CAC GGC TGC CAT
1  M Q L V V I I A V L A L A R M G H G C H
61  TTT GGC TGC CAC CCA ATC AAC TTT AGC ATT CCG GTG AAG AGT TGC GGC CTT ACC GTG AAC
21  F G C H P I N F S I P V K S C G L T V N
121 GTT GAC ACC ACC ATA TGT GCA GGC CAG TGC TTC CAT GCG AAT CCA GCC TAC ATC GGC ATT
41  V D T T I C A G Q C F H A N P A Y I G I
181 GCT GAC AGG GAT GAA CAC AAG GTG TGT AAC GGG GAC TGG ACC TAC GAG GTG AAG CAC ATT
61  A D R D E H K V C N G D W T Y E V K H I
241 GAA GGG TGT CCG GAG AGT ATC AGC TAC GCC GTA GCC AGA AAC TGC AGG TGC GCC GCA TGT
81  E G C P E S I S Y A V A R N C R C A A C
301 GAC CCA GAC AAA ATG TAC TGC AGC CGC TTC CTC GAA GAC ATA CCT AGT TGT CTG CCC TTT
101 D P D K M Y C S R F L E D I P S C L P F
360 TGA
121 *

```

图 1 密斑刺鲀 *fshβ* 基因开放阅读框序列及其推测的氨基酸序列

Fig.1 Open reading frame sequence of *fshβ* gene of *D. hystrix* and its inferred amino acid sequence  
注: ATG 为起始密码子; TGA 为终止密码子; 下划线为信号肽; 黑体字母为功能保守区域; 下划波浪线为 N-糖基化位点; 灰色阴影为半胱氨酸

密斑刺鲀 *lhβ* cDNA 开放阅读框共 420 bp, 编码 139 个氨基酸, 分子量为 15.67 kDa, 理论等电点为 5.61。其中 1~19 位氨基酸为信号肽, 20~139 位氨基酸为成熟肽, 成熟肽部分包含了 12 个保守的半胱氨酸残基, 21~126 位氨基酸为功能结构保守区 GHb。此外, 在 *Lhβ* 氨基酸序列中含有一个 N-糖基化位点(图 2)。

### 2.2 密斑刺鲀 *Fshβ* 和 *Lhβ* 其他功能位点预测

通过 SoftBerry 网站预测 *Fshβ* 和 *Lhβ* 其他功能位点。*Fshβ* 功能位点包括: N-豆蔻酰化位点、异戊烯基团结合位点及微体 C-末端靶向信号(表 2); *Lhβ* 功能位点包括: 蛋白激酶 C 磷酸化位点、N-豆蔻酰化位点、原核膜脂质附着位点、异戊烯基团结合位点及糖

蛋白激素  $\beta$  链特征 1、糖蛋白激素  $\beta$  链特征 2(表 3)。

### 2.3 密斑刺鲀 *Fshβ* 和 *Lhβ* 的氨基酸序列比对及同源性分析

2.3.1 *Fshβ* 的氨基酸序列比对及同源性分析 将密斑刺鲀与红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)、菊黄东方鲀(*Takifugu flavidus*)和尼罗河鲈鱼(*Lates niloticus*)等 9 种脊椎动物 *Fshβ* 的氨基酸序列进行多重序列比对及同源性分析。结果显示, 密斑刺鲀 *Fshβ* 的氨基酸序列与同为鲀形目的菊黄东方鲀的同源性最高, 为 67.5%; 与哺乳类动物小鼠(*Mus musculus*)和智人(*Homo sapiens*)的同源性较低, 分别是 28.3%和 28.7%(图 3)(表 4)。

```

1  ATG TTT GTT TGT TTG CTT GTT TTG ACC CAA CTA CAC TAT CTT CCA TCA GCA GAA GCC TCC
1  M F V C L L V L T Q L H Y L P S A E A S
61  CAG GTG CCG CTC TGT CAA CTC GTC AAC CAG ATG GTG TCT CTG GAG AAG GAA GGT TGT AGC
21  Q V P L C Q L V N Q M V S L E K E G C S
121 ACT TGT CAG CTG GTG GAA ACA ACC ATC TGC AGC GGT CAC TGC GTC ACC AAG GAC CCA CTC
41  T C Q L V E T T I C S G H C V T K D P L
181 ATT AAG CCA CTG GTA CCC TTC GGT TAC CAG CAT GTG TGC ACG TAT AGG AAC CTA CAG TAC
61  I K P L V P F G Y Q H V C T Y R N L Q Y
241 AAG ACG TTT GAG CTG CCC GGG TGT CCA CCC GGC GTG GAC CCG ACT GTC ACC TAC CCC GTG
81  K T F E L P G C P P G V D P T V T Y P V
301 GCT CTA AGC TGC CAC TGT GGC CAC TGC TCC ATG AAC ACG ACT GAC TGC ACC TTC GAG AGC
101 A L S C H C G H C S M N T T D C T F E S
361 CTG CAG CCA GAC TTC TGC AGG AAA GAC ATG CTG CCT TTC TAC AAC TAC TAC TAC ACT TAA
121 L Q P D F C R K D M L P F Y N Y Y Y T *
    
```

图 2 密斑刺鲀 *lhβ* 基因开放阅读框序列及其推测的氨基酸序列

Fig.2 Open reading frame sequence of *lhβ* gene of *D. hystrix* and its inferred amino acid sequence

注: ATG 为起始密码子; TAA 为终止密码子; 下划实线为信号肽; 黑体字母为功能保守区域; 下划波浪线为 N-糖基化位点; 灰色阴影为半胱氨酸

表 2 密斑刺鲀 *Fshβ* 氨基酸序列中的功能位点  
Tab.2 Functional sites in *Fshβ* amino acid sequence of *D. hystrix*

功能位点	所在位置/bp	氨基酸序列
	18~23	GCHFGC
N-豆蔻酰化位点	36~41	GLTVNV
	82~87	GCPESI
异戊烯基团结合位点	35~38	CGLT
	13~15	ARM
微体 C-末端靶向信号	19~21	CHF
	108~110	SRF

表 3 密斑刺鲀 *Lhβ* 氨基酸序列中的功能位点  
Tab.3 Functional sites in *Lhβ* amino acid sequence of *D. hystrix*

功能位点	所在位置/bp	氨基酸序列
蛋白激酶 C 磷酸化位点	74~76	TYR
	38~43	GCSTCQ
N-豆蔻酰化位点	87~92	GCPPGV
	91~96	GVDPTV
原核膜脂质附着位点	94~104	PTVTYPVALSC
异戊烯基团结合位点	4~7	CLLV
	109~112	CSMN
糖蛋白激素 β 链特征 1	50~56	CSGHCVT
糖蛋白激素 β 链特征 2	99~126	PVALSCHCGHCS MNTDCTFESLQ PDFC

2.3.2 *Lhβ* 的氨基酸序列比对及同源性分析 对密斑刺鲀与斑马鱼、高体鲷 (*Seriola dumerili*) 和红鳍

东方鲀等 9 种脊椎动物 *Lhβ* 的氨基酸序列进行多重序列比对及同源性分析。结果显示, 鱼类 *Lhβ* 的氨基酸序列的 C-末端区域十分保守, 但 N-末端区域与其他硬骨鱼类和哺乳动物差异较大(图 4)。密斑刺鲀与同为鲀形目的菊黄东方鲀的同源性最高, 为 70.2%; 与哺乳类动物小鼠和智人的同源性较低, 分别是 44.5% 和 40.6% (表 5)。

2.4 密斑刺鲀 *Fshβ* 和 *Lhβ* 系统进化树分析

运用邻位相连算法(Neighbor-Joining)构建密斑刺鲀与其他脊椎动物 *Fshβ* 和 *Lhβ* 的系统进化树, 以确定密斑刺鲀 *Fshβ* 和 *Lhβ* 的进化关系。结果表明, 脊椎动物 *Fshβ* 聚类为一个独立的进化分支, 而 *Lhβ* 则聚类为另一个独立进化分支。其中密斑刺鲀 *Fshβ* 和 *Lhβ* 与红鳍东方鲀和菊黄东方鲀等鲀型目鱼类的亲缘关系较近(图 5)。

2.5 密斑刺鲀 *Fshβ* 和 *Lhβ* 蛋白质三级结构预测

利用 Swiss-model 网站预测密斑刺鲀和其他脊椎动物 *Fshβ* 和 *Lhβ* 成熟肽的三级结构。结果显示, 密斑刺鲀 *Fshβ* 成熟肽的三级结构与人和红鳍东方鲀的 *Fshβ* 高度相似。而密斑刺鲀 *Lhβ* 成熟肽的三级结构与红鳍东方鲀的 *Lhβ* 结构相似, 但与人的 *Lhβ* 结构差异较大(图 6)。

2.6 密斑刺鲀 *fshβ* 和 *lhβ* 基因的组织表达

通过实时荧光定量的方法检测密斑刺鲀不同组织中 *fshβ* 和 *lhβ* mRNA 的表达水平。结果表明, 密斑刺鲀 *fshβ* 和 *lhβ* 在各组织中都有分布, 在雄鱼和雌鱼垂体中的表达量最高, 在性腺中的表达量次之, 而在心脏、脾脏和肾脏中表达量较低(图 7)。



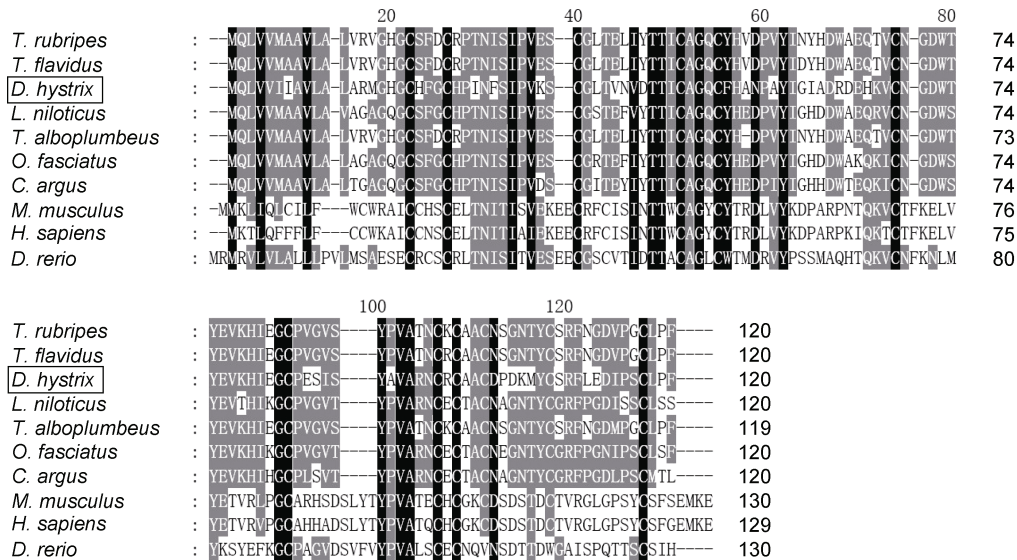


图3 密斑刺鲃与其他物种 Fshβ 氨基酸序列的多重比对

Fig.3 Multiple alignment of Fshβ amino acid sequences between *D. hystrix* and other species

注: 以上各物种的 NCBI 登录号: *Takifugu rubripes* (红鳍东方鲀) XP\_011608222.1, *Takifugu flavidus* (菊黄东方鲀) TWW67736.1, *Lates niloticus* (尼罗河鲈鱼) AKE14361.1, *Takifugu alboplumbeus* (铅点东方鲀) BAJ12081.1, *Oplegnathus fasciatus* (条石鲷) AIZ66846.1, *Channa argus* (乌鳢) KAF3686704.1, *Mus musculus* (小鼠) AAA92804.1, *Homo sapiens* (智人) ABM88373.1, *Danio rerio* (斑马鱼) AAR84282.1

表4 密斑刺鲃 Fshβ 与其他物种的同源性

Tab.4 Homology of Fshβ between *D. hystrix* and other species

物种	同源性/%
斑马鱼( <i>Danio rerio</i> )	31.9
红鳍东方鲀( <i>Takifugu rubripes</i> )	66.7
菊黄东方鲀( <i>Takifugu flavidus</i> )	67.5
尼罗河鲈鱼( <i>Lates niloticus</i> )	63.0
铅点东方鲀( <i>Takifugu alboplumbeus</i> )	66.1
条石鲷( <i>Oplegnathus fasciatus</i> )	63.3
乌鳢( <i>Channa argus</i> )	62.5
小鼠( <i>Mus musculus</i> )	28.3
智人( <i>Homo sapiens</i> )	28.7

## 2.7 性腺发育过程中 *fshβ* 和 *lhβ* 基因在垂体中的表达模式

按照先前的研究(陈华谱等, 2021), 将密斑刺鲃的雌雄性腺分为早、中和晚期共 3 个时期。通过检测在雌雄性腺发育的不同时期, 垂体中 *fshβ* 和 *lhβ* 的表达模式, 发现 *fshβ* 基因在卵巢和精巢发育成熟过程中的表达量均逐渐下降, 而 *lhβ* 基因在卵巢和精巢发育成熟过程中的表达量逐渐增加(图 8)。

## 3 讨论

本研究成功克隆了密斑刺鲃 *fshβ* 和 *lhβ* 基因 cDNA 序列, 并推导出其氨基酸序列。结果显示, 密斑刺鲃 Fshβ 和 Lhβ 的氨基酸序列中, 都含有一个 N-

糖基化位点和 12 个半胱氨酸残基, 具有 Fshβ 和 Lhβ 典型的组成结构。一般认为, N-糖基化位点和半胱氨酸残基对于蛋白质结合特异性受体、形成异二聚体结构和蛋白质折叠等方面十分关键(Gharib *et al*, 1990)。当 Fshβ 和 Lhβ 的序列中 N-糖基化位点和半胱氨酸残基发生突变时, 将不能稳定地与 GtHα 结合并导致其异二聚体结构不稳定(Swanson *et al*, 2003; Kim *et al*, 2005)。研究发现, 在鱼类中 Fshβ 氨基酸序列中 N-糖基化位点的数量有差异。密斑刺鲃 Fshβ 只含有一个 N-糖基化位点, 与齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*) (曹洪涛, 2010)和美洲条纹狼鲈(Hassin *et al*, 1995)等结果一致, 而在漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*) (柳学周等, 2014)和大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) (高云红, 2020)中, Fshβ 含有两个 N-糖基化位点。第二个糖基化位点兼具与受体结合以及增强信号转导活性的功能(Flack *et al*, 1994)。根据同源性分析的结果, 密斑刺鲃 Fshβ 和 Lhβ 亚基与同为鲀形目鱼类的同源性最高, 与在其他鱼类中的研究相类似(Kato *et al*, 1993; Quéirat *et al*, 2000; Ando *et al*, 2004)。此外, 通过构建系统进化树分析, 发现密斑刺鲃 Fshβ 和 Lhβ 分别与其他物种的 Fshβ 和 Lhβ 聚为一支, 且均与同为鲀形目的物种亲缘关系最近, 与哺乳类的亲缘关系较远, 符合其传统的分类地位与进化关系(黄小琪等, 2020)。但有意思的是, 通过 Fshβ 和 Lhβ 亚

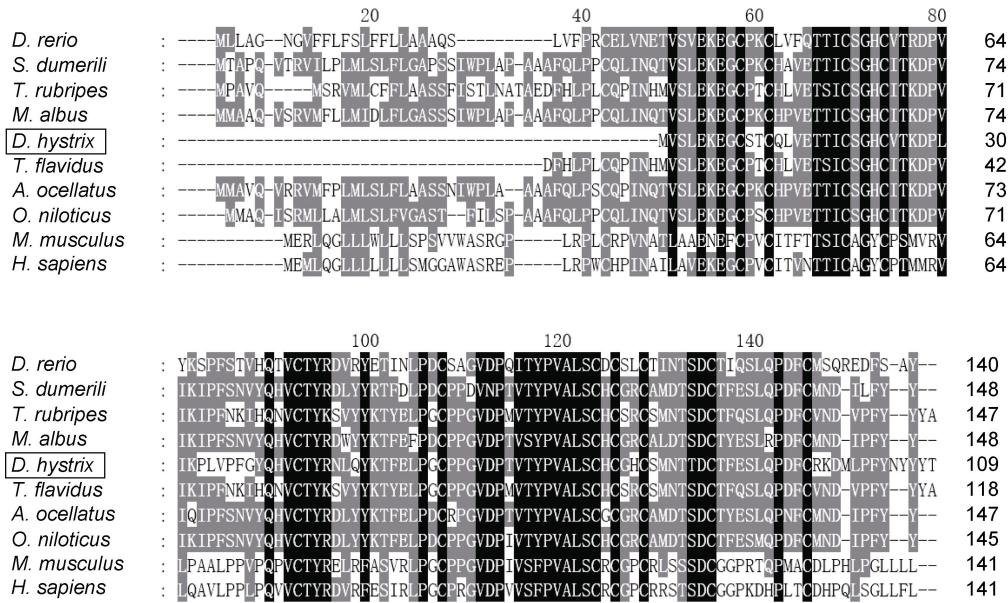


图 4 密斑刺鲃与其他物种 Lhβ 氨基酸序列的多重比对

Fig.4 Multiple alignment of Lhβ amino acid sequences between *D. hystrix* and other species

注: 以上各物种的 NCBI 登录号: *Danio rerio* (斑马鱼) AAV31153.1, *Seriola dumerili* (高体鲷) XP\_022603873.1, *Takifugu rubripes* (红鳍东方鲃) XP\_011601356.1, *Monopterus albus* (黄鳍) XP\_020462355.1, *Takifugu flavidus* (菊黄东方鲃) TWW78441.1, *Anarrhichthys ocellatus* (狼鲛) XP\_031694696.1, *Oreochromis niloticus* (尼罗罗非鱼) XP\_025753499.1, *Mus musculus* (小鼠) EDL22853.1, *Homo sapiens* (智人) KAI14043840.1

表 5 密斑刺鲃 Lhβ 与其他物种的同源性

Tab.5 Homology of Lhβ between *D. hystrix* and other species

物种	同源性/%
斑马鱼( <i>Danio rerio</i> )	53.0
高体鲷( <i>Seriola dumerili</i> )	70.1
红鳍东方鲃( <i>Takifugu rubripes</i> )	68.5
黄鳍( <i>Monopterus albus</i> )	68.9
菊黄东方鲃( <i>Takifugu flavidus</i> )	70.2
狼鲛( <i>Anarrhichthys ocellatus</i> )	62.0
智人( <i>Homo sapiens</i> )	40.6
尼罗罗非鱼( <i>Oreochromis niloticus</i> )	66.7
小鼠( <i>Mus musculus</i> )	44.5

基的氨基酸序列三级结构分析, 发现从鱼类到哺乳类其 Fshβ 亚基三级结构非常相似, 而 Lhβ 亚基的差异较大, 这可能与氨基酸序列差异相关。Lhβ 氨基酸序列 C-末端区域保守性较高, 但 N-末端区域与其他硬骨鱼类和哺乳动物存在较大差异, 猜测是在进化过程中产生了部分氨基酸缺失(黄小琪等, 2020)。

根据组织分布的检测结果, *fshβ* 和 *lhβ* 基因在密斑刺鲃各组织中的表达具有显著的差异, 但雌雄个体之间的组织分布情况高度相似, 均在垂体中表达量最高, 其次是性腺。垂体组织是密斑刺鲃分泌促性腺激素最关键的组织, 而多组织表达的特性, 也预示

着 *fshβ* 和 *lhβ* 基因可能还参与了鱼体内其他的生理过程, 与斑马鱼(So *et al*, 2005)、丝鳍毛足鲈(*Trichogaster trichopterus*) (Jackson *et al*, 1999)和金头鲷(*Sparus aurata*) (Meiri *et al*, 2004)中的研究结果相吻合。此外, 在早期的部分鱼类研究中发现促性腺激素仅在垂体中特异性表达, 不具有广泛分布的特性(Tyler *et al*, 1991; Kagawa *et al*, 1998a; 牛艳东等, 2008), 可能是由于不同物种间的差异, 或不同的发育状态, 亦或是受限早期检测技术的较低灵敏度而产生的差异结果。众所周知, 促性腺激素的受体在不同组织中均有广泛的分布, 而促性腺激素作为分泌性蛋白, 可伴随血液循环系统作用到不同组织, 由此, 关于 *fshβ* 和 *lhβ* 的其他生理功能仍有待发掘。

密斑刺鲃垂体中 *fshβ* 和 *lhβ* 基因在性腺发育不同时期中具有不同的表达模式。在卵巢和精巢发育早期, *fshβ* 在垂体组织中具有较高的表达量, 随着性腺的进一步成熟, *fshβ* 的表达量逐渐降低, 表明 Fsh 是密斑刺鲃性腺发育早期起主导作用的促性腺激素类型, 主要调控性腺早期的发育。而在雌雄性腺发育早期, 密斑刺鲃 *lhβ* 基因在垂体组织中的表达量较低, 但随着性腺发育而逐渐升高, 表明 Lh 参与调控性腺发育成熟后期。密斑刺鲃 *fshβ* 和 *lhβ* 基因在性腺发育过程的表达模式与大刺鲃(*Mastacembelus armatus*) (黄小

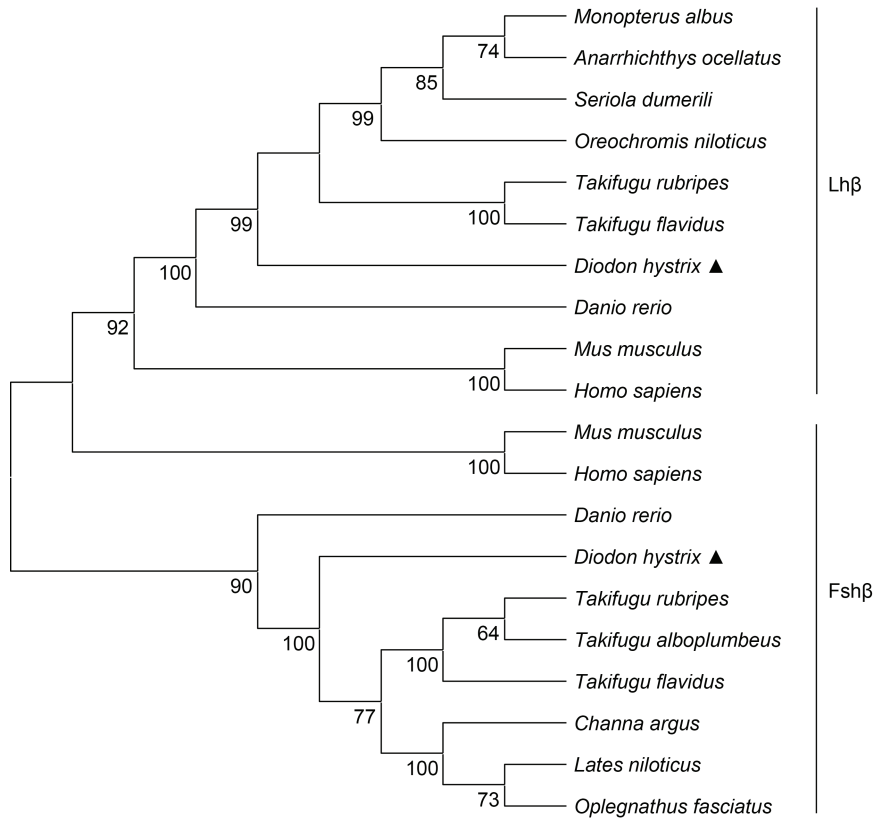


图 5 Fshβ 和 Lhβ 系统进化树

Fig.5 The analysis of phylogenetic tree of Fshβ and Lhβ

注: 系统进化树中结点处数值代表 1000 次评估的自举检验置信度; 三角形表示本研究对象 *Diodon hystrix*

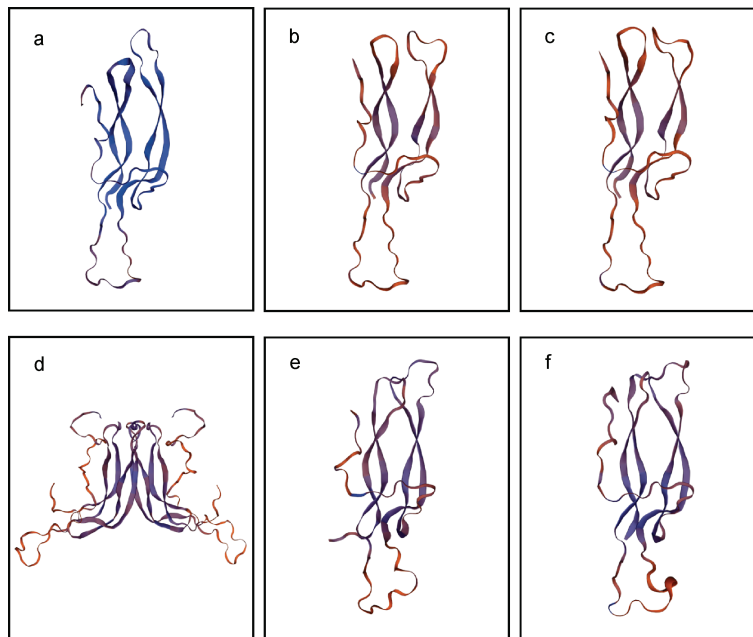


图 6 密斑刺鲃和其他脊椎动物 Fshβ、Lhβ 成熟肽的三级预测结构

Fig.6 The predicted 3D structures of Fshβ and Lhβ mature peptides in *D. hystrix* and other vertebrates

注: a. 人 Fshβ 成熟肽; b. 密斑刺鲃 Fshβ 成熟肽; c. 红鳍东方鲃 Fshβ 成熟肽; d. 人 Lhβ 成熟肽; e. 密斑刺鲃 Lhβ 成熟肽; f. 红鳍东方鲃 Lhβ 成熟肽

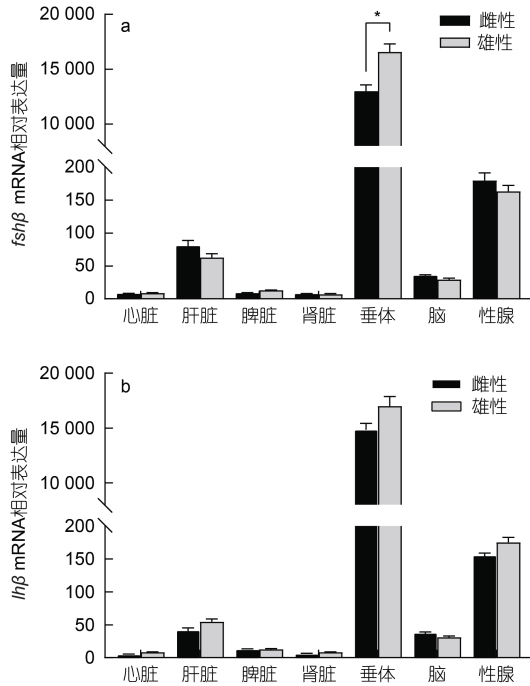


图 7 密斑刺鲃 *fshβ* 和 *lhβ* 基因在不同组织中的表达  
Fig.7 Expressions of *fshβ* and *lhβ* in different tissues of *D. hystrix*

注: a. *fshβ*; b. *lhβ*。数据以平均值±平均标准方差表示( $n=3$ ), 统计差异表示为\* $P<0.05$

琪等, 2020)和条石鲷(陈圣毅等, 2014)等研究结果相一致, 也和传统的认知相同, Fsh 作用于性腺发育的早期, Lh 主要作用于性腺发育的后期。但在鱼类中, 关于 *fshβ* 和 *lhβ* 基因在性腺发育不同时期的表达同样存在着多样性。在漠斑牙鲆的研究中发现, 垂体中 *fshβ* 在卵巢发育的早期的表达量较低, 到卵巢成熟时, *fshβ* 的表达量显著升高(柳学周等, 2014)。在草鱼(Zhou *et al.*, 2010)的研究中, 发现 *fshβ* 和 *lhβ* 在草鱼性腺发育过程中具有相同的表达模式, 二者共同调控草鱼性腺的发育和成熟。这表明鱼类 Fsh 和 Lh 在发挥生殖调控功能中存在着明显的种间差异和生理功能差异。

#### 4 结论

本研究克隆鉴定了密斑刺鲃 *fshβ* 和 *lhβ* 基因的 cDNA 序列, 并进行了序列及结构分析, 发现 Fshβ 和 Lhβ 都含有一个 N-糖基化位点和 12 个半胱氨酸残基, 在硬骨鱼中 Fshβ 和 Lhβ 都与同为鲈形目的物种亲缘关系较近。同时, 发现了 *fshβ* 和 *lhβ* 在所有组织中均有表达, 在垂体中的表达量最高, 这预示着除了参与性腺发育调控外, *fshβ* 和 *lhβ* 基因在密斑刺鲃中可能

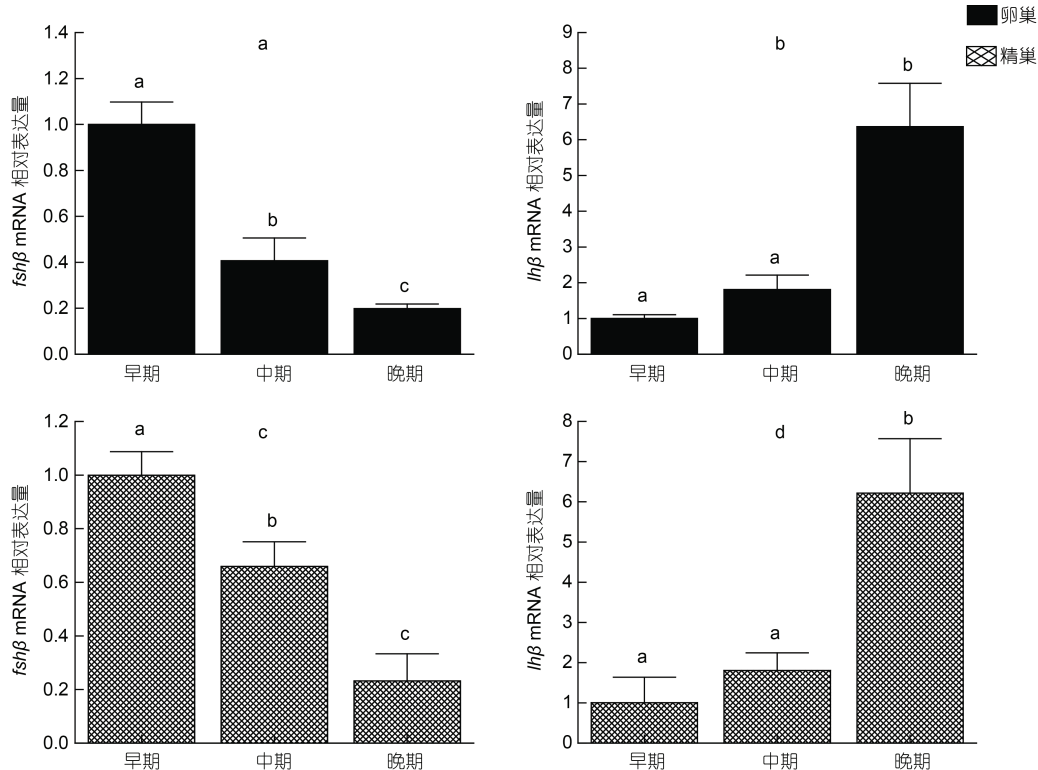


图 8 密斑刺鲃不同性腺发育时期 *fshβ* 和 *lhβ* 基因在垂体中的表达

Fig.8 The expression of *fshβ* and *lhβ* in the pituitary of *D. hystrix* at different gonadal development stages

注: 垂体中 *fshβ* (a)和 *lhβ* (b)在不同卵巢发育时期的表达; 垂体中 *fshβ* (c)和 *lhβ* (d)在不同精巢发育时期的表达。数据以平均值±平均标准方差表示( $n=5$ ); 上标不同的字母表示组间的显著性差异( $P<0.05$ )



参与更多样化的调控过程。此外, 密斑刺鲃垂体中 *fsh $\beta$*  和 *lh $\beta$*  基因在性腺发育不同时期的表达模式提示, Fsh 主要在性腺发育早期起主导作用, 而性腺发育晚期则主要由 Lh 发挥功能。本研究为密斑刺鲃生殖调控机制研究提供了一定的理论基础。

### 参 考 文 献

- 牛艳东, 周毅, 陶敏, 等, 2008. 鳙鱼(*Hypophthalmichthys nobilis*)促性腺激素  $\beta$  亚基的克隆、表达和序列分析[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 31(2): 120-124.
- 陈圣毅, 柳学周, 史宝, 等, 2014. 条石鲷促性腺激素  $\beta$  (FSH, LH)亚基 cDNA 克隆及表达特性分析[J]. 水产学报, 38(10): 1673-1686.
- 陈华谱, 洪广, 刘燕华, 等, 2017. 泰国斗鱼抗缪勒氏管激素 (AMH)基因 cDNA 克隆及表达[J]. 广东海洋大学学报, 37(6): 84-88.
- 陈华谱, 黄春仁, 何睿祺, 等, 2021. 密斑刺鲃(*Diodon hystrix*) *gnrh* 基因的克隆及表达分析[J]. 海洋与湖沼, 52(4): 994-1006.
- 柳学周, 臧坤, 徐永江, 等, 2014. 漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*) *LH $\beta$*  基因克隆及其在卵巢不同发育期的表达特征[J]. 渔业科学进展, 35(4): 22-31.
- 高云红, 2020. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*. L)垂体促性腺激素生理功能研究[D]. 上海: 上海海洋大学.
- 黄小琪, 钟东明, 何佩莹, 等, 2020. 大刺鲈促黄体生成素基因克隆及其组织表达分析[J]. 南方农业学报, 51(7): 1706-1713.
- 曹洪涛, 2010. 齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)*FSH $\beta$*  亚基与 *LH $\beta$*  亚基 cDNA 全序列克隆及生物信息学分析[D]. 雅安: 四川农业大学.
- 翟毅, 刘建业, 贾丽英, 等, 2018. 金钱鱼 *cyp17a1* 基因克隆、组织分布及在卵巢发育中的表达[J]. 广东海洋大学学报, 38(5): 1-7.
- ANDO H, SWANSON P, KITANI T, *et al*, 2004. Synergistic effects of salmon gonadotropin-releasing hormone and estradiol-17 $\beta$  on gonadotropin subunit gene expression and release in masu salmon pituitary cells *in vitro* [J]. General and Comparative Endocrinology, 137(1): 109-121.
- BANERJEE A, KHAN I A, 2008. Molecular cloning of FSH and LH  $\beta$  subunits and their regulation by estrogen in Atlantic croaker [J]. General and Comparative Endocrinology, 155(3): 827-837.
- CHANG Y S, HUANG C J, HUANG F L, *et al*, 1988. Primary structures of carp gonadotropin subunits deduced from cDNA nucleotide sequences [J]. International Journal of Peptide and Protein Research, 32(6): 556-564.
- CHANG Y S, HUANG C J, HUANG F L, *et al*, 1990. Purification, characterization, and molecular cloning of gonadotropin subunits of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. General and Comparative Endocrinology, 78(1): 23-33.
- CHEN H P, CUI X F, WANG Y R, *et al*, 2020. Identification, functional characterization, and estrogen regulation on gonadotropin-releasing hormone in the spotted scat, *Scatophagus argus* [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 46(5): 1743-1757.
- CHEN H P, LI Z Y, WANG Y R, *et al*, 2021. Comparison of gonadal transcriptomes uncovers reproduction-related genes with sexually dimorphic expression patterns in *Diodon hystrix* [J]. Animals, 11(4): 1042.
- DEGANI G, GOLDBERG D, TZCHORI I, *et al*, 2003. Cloning of European eel (*Anguilla anguilla*) FSH- $\beta$  subunit, and expression of FSH- $\beta$  and LH- $\beta$  in males and females after sex determination [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 136(2): 283-293.
- FIDDES J C, TALMADGE K, 1984. Structure, expression, and evolution of the genes for the human glycoprotein hormones [M] // GREEP R O. Recent Progress in Hormone Research. Amsterdam: Academic Press: 43-78.
- FLACK M R, FROEHLICH J, BENNET A P, *et al*, 1994. Site-directed mutagenesis defines the individual roles of the glycosylation sites on follicle-stimulating hormone [J]. Journal of Biological Chemistry, 269(19): 14015-14020.
- GHARIB S D, WIERNAN M E, SHUPNIK M A, *et al*, 1990. Molecular biology of the pituitary gonadotropins [J]. Endocrine Reviews, 11(1): 177-199.
- GUZMÁN J M, LUCKENBACH J A, DA SILVA D A M, *et al*, 2018. Seasonal variation of pituitary gonadotropin subunit, brain-type aromatase and sex steroid receptor mRNAs, and plasma steroids during gametogenesis in wild sablefish [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 219-220: 48-57.
- HASSIN S, ELIZUR A, ZOHAR Y, 1995. Molecular cloning and sequence analysis of striped bass (*Morone saxatilis*) gonadotrophin-I and -II subunits [J]. Journal of Molecular Endocrinology, 15(1): 23-35.
- JACKSON K, GOLDBERG D, OFIR M, *et al*, 1999. Blue gourami (*Trichogaster trichopterus*) gonadotropic beta subunits (I and II) cDNA sequences and expression during oogenesis [J]. Journal of Molecular Endocrinology, 23(2): 177-187.
- JENG S R, YUEH W S, CHEN G R, *et al*, 2007. Differential expression and regulation of gonadotropins and their receptors in the Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. General and Comparative Endocrinology, 154(1/2/3): 161-173.
- KAGAWA H, KAWAZOE I, TANAKA H, *et al*, 1998a. Immunocytochemical identification of two distinct gonadotropic cells (GTH I and GTH II) in the pituitary of bluefin tuna, *Thunnus thynnus* [J]. General and Comparative Endocrinology, 110(1): 11-18.
- KAGAWA H, TANAKA H, OKUZAWA K, *et al*, 1998b. GTH II but not GTH I induces final maturation and the development of maturational competence of oocytes of red seabream *in vitro* [J]. General and Comparative Endocrinology, 112(1): 80-88.
- KATO Y, GEN K, MARUYAMA O, *et al*, 1993. Molecular cloning of cDNAs encoding two gonadotrophin beta subunits (GTH-I beta and -II beta) from the masu salmon,

- Oncorhynchus masou*: rapid divergence of the GTH-I beta gene [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 11(3): 275-282.
- KIM D J, CHO Y C, SOHN Y C, 2005. Molecular characterization of rockfish (*Sebastes schlegeli*) gonadotropin subunits and their mRNA expression profiles during oogenesis [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 141(3): 282-290.
- MEIRI I, KNIBB W R, ZOHAR Y, *et al*, 2004. Temporal profile of  $\beta$  follicle-stimulating hormone,  $\beta$  luteinizing hormone, and growth hormone gene expression in the protandrous hermaphrodite, gilthead seabream, *Sparus aurata* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 137(3): 288-299.
- NAKANE P K, 1970. Classifications of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry [J]. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 18(1): 9-20.
- PIERCE J G, PARSONS T F, 1981. Glycoprotein hormones: structure and function [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 50: 465-495.
- QUÉRAT B, SELLOUK A, SALMON C, 2000. Phylogenetic analysis of the vertebrate glycoprotein hormone family including new sequences of sturgeon (*Acipenser baeri*)  $\beta$  subunits of the two gonadotropins and the thyroid-stimulating hormone [J]. *Biology of Reproduction*, 63(1): 222-228.
- SO W K, KWOK H F, GE W, 2005. Zebrafish gonadotropins and their receptors: II. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits--their spatial-temporal expression patterns and receptor specificity [J]. *Biology of Reproduction*, 72(6): 1382-1396.
- SWANSON P, DICKEY J T, CAMPBELL B, 2003. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1/2/3/4): 53-59.
- TYLER C R, SUMPTER J P, KAWAUCHI H, *et al*, 1991. Involvement of gonadotropin in the uptake of vitellogenin into vitellogenic oocytes of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 84(2): 291-299.
- WELTZIEN F A, ANDERSSON E, ANDERSEN Ø, *et al*, 2004. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (*Pleuronectiformes*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 137(3): 447-477.
- WELTZIEN F A, NORBERG B, HELVIK J V, *et al*, 2003. Identification and localization of eight distinct hormone-producing cell types in the pituitary of male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 134(2): 315-327.
- ZHOU Y, NIU Y D, TAO M, *et al*, 2010. Molecular cloning, characterization and expression of FSH and LH beta subunits from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36(2): 213-221.

## CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF *fsh $\beta$* AND *lh $\beta$* GENE IN *DIODON HYSTRIX*

GUO Yu-Wen, LI Yi-Kai, DAI Ming-Shu, LIANG Jun-Hao, HUANG Yan-Lin,  
LI Guang-Li, CHEN Hua-Pu

(Guangdong Research Center on Reproductive Control and Breeding Technology of Indigenous Valuable Fish Species, Guangdong Provincial Engineering Laboratory for Mariculture Organism Breeding, Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

**Abstract** *Diodon hystrix* is a well-known economic fish in the South China Sea with high edible and medicinal value. However, studies on the reproduction of *D. hystrix* are few, which hinder the development of its artificial breeding. Gonadotropic hormone (GtH) is one of the key hormones for reproductive regulation, and plays a connecting role in the reproductive regulation axis. We cloned the cDNA sequences of *fsh $\beta$*  and *lh $\beta$*  genes from *D. hystrix* by molecular cloning techniques. Through bioinformatics analysis, we found that the open reading frame (ORF) of *fsh $\beta$*  cDNA contains 363 bp, encoding 120 amino acids, while the ORF of *lh $\beta$*  cDNA contains 420 bp, encoding 139 amino acids. Sequence alignment and phylogenetic tree analyses showed that both Fsh $\beta$  and Lh $\beta$  of *D. hystrix* are similar to those of fishes of the family Tetraodontidae. According to the tertiary structure analysis, we found that the tertiary structure of Fsh $\beta$  is highly conservative, while the tertiary structure of Lh $\beta$  is moderately conservative. The tissue distribution of *fsh $\beta$*  and *lh $\beta$*  genes in *D. hystrix* was detected by qRT-PCR. Results show that the expression of both *fsh $\beta$*  and *lh $\beta$*  was the highest in the pituitary, followed by the gonads. In addition, we detected the expression patterns of *fsh $\beta$*  and *lh $\beta$*  genes during the development of male and female gonads, and found that the expression of *fsh $\beta$*  gene in the pituitary gradually decreased with the development of gonads, while the expression of *lh $\beta$*  gene gradually increased. This study provided a theoretic basis for constructing the reproductive regulatory network of *D. hystrix*.

**Key words** *Diodon hystrix*; *fsh $\beta$* ; *lh $\beta$* ; molecular cloning; expression pattern