

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)促性腺激素受体 在雄性生殖周期中的表达*

陈晓燕 温海深 何峰 李吉方 陈彩芳 张葭人
金国雄 史宝 史丹 杨艳平

(中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室 青岛 266003)

摘要 采用 RT-PCR 方法,研究了促性腺激素受体(FSHR 和 LHR)基因在雄性半滑舌鳎繁殖周期中的季节表达规律。结果表明,FSHR mRNA 在雄鱼精巢、脑和脾中及 LHR mRNA 在雄鱼的精巢和脾中均呈季节规律性变化。3 月份样品中,FSHR mRNA 在精巢表达量最低,12 月份,表达量最高;FSHR mRNA 在脑中表达模式与精巢相反,3 月份表达量最高,12 月份达到最低值;FSHR mRNA 在脾中表达模式和精巢相同。在 6 月份精巢样品中,LHR mRNA 表达量最低,12 月表达量最高;在脾中,LHR mRNA 在 3 月份表达量最低,12 月份表达量最高。在精巢中,FSHR mRNA 和 LHR mRNA 都是在排精时表达量达到最大值,说明这两种受体在雄性半滑舌鳎排精时发挥重要作用。

关键词 半滑舌鳎,FSHR,LHR,基因表达,精巢,脑,脾

中图分类号 S963

硬骨鱼类存在两种促性腺激素(GtH I 和 GtH II),分别与哺乳动物的促滤泡激素(Follicle-stimulating hormone,FSH)和促黄体激素(Luteinizing hormone,LH)相对应(林浩然,1999)。促性腺激素在体内的重要生理功能由促性腺激素受体介导(Schulz *et al.*,2001)。高等动物 LH(GtH II)在体内的重要生理功能由促黄体激素受体(Luteinizing hormone receptor,LHR)介导,FSH(GtH I)的生理功能则主要由促滤泡激素受体(Follicle-stimulating hormone receptor,FSHR)介导(Themmen *et al.*,2000;Ascoli *et al.*,2002;Vassart *et al.*,2004)。

目前,对鱼类促性腺激素受体的相关研究表明,促性腺激素受体在鱼类配子发生的特定时期发挥功能。雄鱼中,FSHR 基因 mRNA 表达量在繁殖周期启动时变化不大,精子发生时显著增加,在排精时达到最大值(Kusakabe *et al.*,2006;Maugars *et al.*,2006;Sambroni *et al.*,2007);LHR 基因 mRNA 在排精时表达量达到最高值(Swanson *et al.*,1997;Hirai *et al.*,2002;

Rahman *et al.*,2003;Kwok *et al.*,2005)。上述研究结果表明 FSHR 和 LHR 基因表达可能与精子发生和排放在存在密切联系,主要在精巢的最后成熟时期起重要作用,可能与下丘脑的调控相关(丁福红等,2010)。另外,现有的研究表明 FSHR 基因和 LHR 基因除了在鱼类性腺中大量表达外,在非性腺组织中也有表达(Kumar *et al.*,2001a,b;Vischer *et al.*,2003;Rocha *et al.*,2007;Kobayashi *et al.*,2008),而关于 FSHR 和 LHR 在非性腺组织中的季节表达模式未见相关报道。

自然条件下,半滑舌鳎雌雄个体异形,雄性鱼类生殖能力微弱,造成自然状况下卵子受精率很低,加之近年来过度捕捞,以及海域污染等方面的影响,使得自然海区半滑舌鳎产量锐减,捕捞规格也越来越小。因此,研究雄性半滑舌鳎繁殖生理机能,具有重要的理论意义和巨大的经济价值。

本文以人工养殖雄性半滑舌鳎为对象,基于本研究室已经克隆的 FSHR 全长 cDNA 序列和 LHR 主要功能区片段,采用 RT-PCR 方法,系统研究了

* 国家“十一五”科技支撑计划资助课题资助,2006BAD09A01 号。陈晓燕, E-mail: sichen24@yahoo.com.cn

通讯作者: 温海深, 教授, E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn

收稿日期: 2010-04-25, 收修改稿日期: 2010-06-18

FSHR 和 LHR 在半滑舌鲷雄鱼生殖周期中某些器官组织中的季节表达模式。通过这些研究,查明促性腺激素受体在雄性半滑舌鲷生殖周期的生理作用,以期为阐明半滑舌鲷内分泌生理机制提供科学依据,同时为进行半滑舌鲷生殖调控与育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验样品

2007年2月—2008年3月,分批次从烟台莱州某养殖场购买人工养殖的性成熟半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)雄鱼,选取18尾雄性半滑舌鲷用于本实验,测量各生物学指标(表1),计算精巢成熟指数(*GSI*);解剖后迅速取出精巢、肝脏、胃、肠、鳃、心、脾、肾、头肾、脑和肌肉等器官组织保存于-80℃超低温冰箱;采用H.E染色观察精巢性腺发育分期。

表1 半滑舌鲷雄鱼的各项生物学指标
Tab.1 The biological index of male *C. semilaevis* in the experiment

序号	体重(g)	体长(cm)	净重(g)	性腺重(g)	采集月份
1	245.6	31.8	217.3	1.2262	3
2	46.8	18.5	40.6	0.0376	3
3	62.9	19.9	53.5	0.0432	3
4	105.8	25.2	92.9	0.2904	3
5	203.9	31.9	189.8	1.0011	6
6	219.1	32.6	202.3	1.0927	6
7	204.6	31.7	189.6	0.9590	6
8	274.2	34.4	248.0	1.3849	6
9	199.2	32.3	186.7	0.9206	9
10	205.9	30.5	189.5	1.2246	9
11	216.9	32.9	194.7	1.4563	9
12	316.0	35.8	291.6	1.3154	9
13	235.3	32.9	218.9	1.3041	9
14	271.3	34.3	235.1	1.2426	12
15	320.5	36.4	285.4	0.9067	12
16	377.7	36.5	346.0	1.5501	12
17	287.2	35.6	256.0	1.1720	12
18	224.8	32.3	204.8	1.1426	12

1.2 试剂

本实验所用PCR特异性引物均由上海生工生物技术公司合成。*Taq*酶、*Dnase I* (RNasefree)、RNasin购自TaKaRa公司, RNA提取试剂Trizol Reagent为Invitrogen公司产品, M-MLV购自Promega公司,其余均为国产分析纯试剂。

1.3 总RNA的提取和cDNA的合成

半滑舌鲷各组织总RNA的提取按照Trizol试剂盒说明书进行, cDNA第一链利用Oligo dT18来合成,对合成的cDNA第一链进行 β -actin持家基因检测,确定所得到的cDNA第一链是否可用。合成的cDNA于-40℃保存备用。

1.4 FSHR基因在雄性半滑舌鲷精巢、脑和脾中的表达

各组织cDNA稀释后取1 μ l作为模板进行PCR扩增。利用Primer5.0软件根据本实验室克隆的半滑舌鲷FSHR基因序列(Genbank登录号为Eu661784)设计一对PCR特异性引物FSHRF1和FSHRR1(引物见表2)。PCR反应条件为94℃预变性5min, 94℃35s, 60.3℃35s, 72℃35s共34个循环, 72℃10min。18S rRNA作为反应的内参照物, 引物序列见孙业盈等(2008), 引物见表2。18S rRNA所进行的PCR反应条件为94℃预变性5min, 94℃35s, 61℃35s, 72℃35s共26个循环, 72℃10min。取8 μ l的PCR产物进行电泳。对电泳结果采用Tanon GIS凝胶图象处理系统进行分析。实验所得数据采用SPSS 13.0统计软件中的Duncan's法进行数据处理和检验分析, 当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。用Excel表格生成柱状图, 所用数据均表示为平均数 \pm 标准误(Mean \pm SE)。

1.5 LHR基因在雄性半滑舌鲷精巢和脾中的表达

根据已得到的半滑舌鲷LHR基因序列(Genbank登录号为EU932913)设计特异性引物LHRF1和LHRR1(表2), 采用RT-PCR法来检测LHR mRNA在雄性半滑舌鲷精巢和脑中的表达情况, PCR反应条件为94℃预变性5min, 94℃35s, 53.4℃35s, 72℃35s共44个循环, 72℃10min。以18S rRNA的表达作为内参照, 引物为18S F和18S R(表2), 用2%琼脂糖凝胶检测PCR产物, 对电泳结果采用凝胶图象分析系统进行处理, 数据处理同1.4。

表2 半滑舌鲷LHR基因克隆和表达所用的引物
Tab.2 Primers used in the cloning and transcript level analysis of *C. semilaevis* LHR

引物名称	引物序列(5'—3')	扩增序列长度
FSHRF1	CACACCATCACGTATGCTCTG	264bp
FSHRR1	GACAGTCAGATAGATGCTGA	
LHRF1	CATCATCAACGCCATGCATGTC	208bp
LHRR1	GACGTTGAGGATGAGCACAG	
18S F	CCTGAGAAACGGCTACCACATC	119bp
18S R	CCAATTACAGGGCCTCGAAAG	

2 结果

2.1 雄性半滑舌鲷精巢发育及其成熟指数(GSI)季节变化

雄性半滑舌鲷性腺发育处于四个时期, 3、6、9、12 月份精巢分别处于 、 、 、 期(图 1)。

根据全年采样数据统计分析, 精巢性腺成熟指数表现出规律的年周期变化(图 2)。GSI 在 3 月份时数值最低, 均值为 0.26 (n=4); 6 月份时显著增加, 均值为 0.53 (n=4); 9 月份时又有所升高, 均值为 0.58 (n=5); 此后开始下降, 12 月份时均值为 0.46 (n=5)。

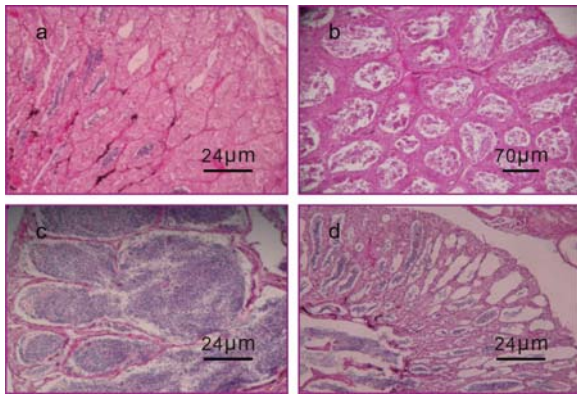


图 1 半滑舌鲷精巢组织学分期

Fig.1 Histological transverse sections in the testis of *C. semilaevis*

a: 期精巢, b: 期精巢, c: 期精巢, d: 期精巢

2.2 FSHR 和 LHR 基因在半滑舌鲷组织中的表达

采用 RT-PCR 法, 检测 FSHR 和 LHR 基因在雄性半滑舌鲷的卵巢、精巢、肝脏、胃、肠、鳃、心、脾、肾、头肾、脑和肌肉 12 种组织中的表达。结果表明, FSHR 基因 mRNA 在雄性半滑舌鲷各器官组织中表达广泛, 尤其以脾、肾、头肾中表达最为强, 卵巢、精巢次之(图 3)。LHR 基因除在肌肉中没有表达外, 在上述其它 11 种组织中均有表达, 且以脾和肾中表达最丰富(图 3)。

2.3 FSHR 基因在雄性半滑舌鲷精巢、脑和脾中的季节表达

采用 RT-PCR 方法对 FSHR mRNA 在雄性半滑舌鲷的精巢、脑和脾中的表达进行了季节变化分析。结果显示, FSHR mRNA 在 3 种组织中的表达均呈现周期性变化(图 4)。

精巢中, FSHR mRNA 在 3 月份

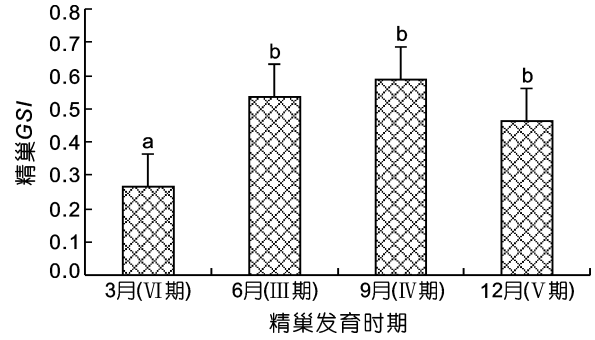


图 2 养殖半滑舌鲷精巢 GSI 的周年变化

Fig.2 Profiles of gonadosomatic index in male cultured *C. semilaevis*

注: 相同字母表示差异不显著 $P>0.05$, 不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下同

(期)时, 表达量最低, 相对表达量(FSHR/18S)的平均值为 0.69 (n=4), 在 6 月份时缓慢升高, 表达量均值为 0.72 (n=4), 到了 9 月份时, 与 6 月份相比变化不大, 表达量平均为 0.72 (n=3), 达到 12 月份时, 表达量达到最大值, 平均为 0.97 (n=3)。

脑中, FSHR mRNA 在 3 月份时, 表达量最高, 相对表达量(FSHR/18S)的平均值为 1.40 (n=3), 到达 6 月份时表达量开始下降, 均值为 0.98 (n=3), 到 9 月份时减少, 表达量均值为 0.89 (n=4), 在 12 月份时降低到最小值, 表达量平均值为 0.77 (n=5)。

脾中, FSHR mRNA 相对表达量在三月份时最少, 平均值为 0.41 (n=4), 到 6 月份时, 表达量显著增加, 均值为 0.79 (n=4), 在 9 月份时, FSHR mRNA 表达量持续升高, 达到最大值, 均值为 1.00 (n=5), 随后在 12 月份时, 其表达量开始有所下降, 表达量均值为 0.97 (n=4)。

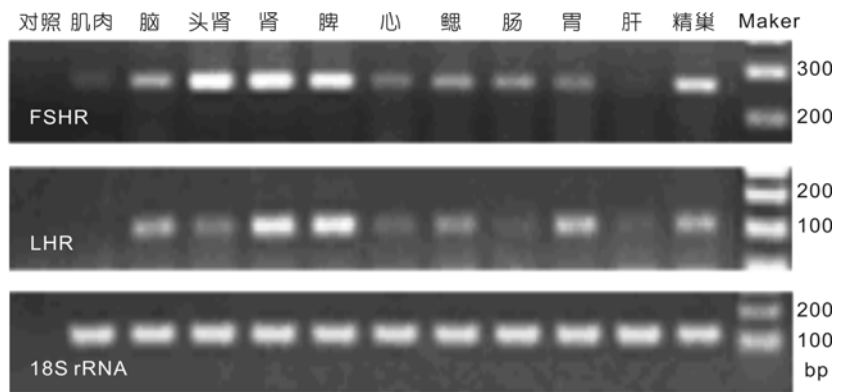


图 3 FSHR 和 LHR 基因在雄性半滑舌鲷组织中的表达

Fig.3 The distribution of male *C. semilaevis* FSHR and LHR transcripts in different tissues

2.4 LHR 基因在雄性半滑舌鲷精巢和脾中的季节表达

采用 RT-PCR 方法对 LHR mRNA 在雄性半滑舌鲷精巢和脾中表达进行季节变化分析, 结果显示 LHR mRNA 在 2 种组织中的表达均呈现周期性变化(图 5)。

精巢中 LHR mRNA 表达量在 6 月时表达量最低, 均值为 0.53 ($n=3$), 9 月时表达量均值为 0.57 ($n=3$); 12 月时表达量达到峰值, 为 0.95 ($n=3$), 然后开始下降, 3 月时表达量均值为 0.76 ($n=3$)。

脾中 LHR mRNA 表达量变化趋势与精巢中一致, 都是在 6 月时表达量最低, 均值为 0.23 ($n=6$); 12 月时表达量最高, 均值为 0.49 ($n=4$); 6 月和 12 月表达量差异显著; 9 月和 1 月表达量均值分别为 0.40 ($n=6$)和 0.26 ($n=4$)。

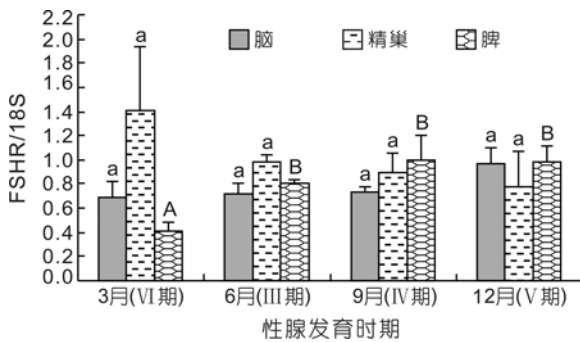


图 4 半滑舌鲷 FSHR mRNA 在雄鱼精巢、脑和脾中的表达变化

Fig.4 The seasonal changes of male *C. semilaewis* FSHR transcriptional levels in testis, brain, and spleen

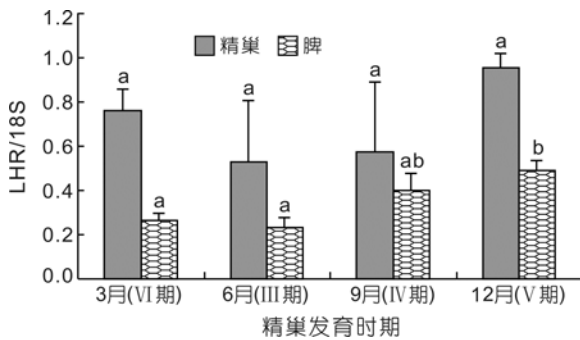


图 5 半滑舌鲷 LHR mRNA 在雄鱼精巢和脾中表达变化
Fig.5 The seasonal change of male *C. semilaewis* LHR transcriptional level in testis and spleen

3 讨论

作为促性腺激素的受体, FSHR 和 LHR 在调控鱼类性腺发育和配子成熟中起重要的作用, 目前关于鱼类性腺发育周期中 FSHR 和 LHR 基因表达模式的

相关研究也已展开, 其中涉及雄鱼精巢中 FSHR 和 LHR 的基因表达特点也有相关报道, 研究表明, FSHR 和 LHR 一般在雄鱼排精时表达量最高, 主要参与精巢的最后成熟和精子的排放作用。

本实验中, FSHR mRNA 和 LHR mRNA 在雄性半滑舌鲷的精巢中都有规律性的季节性表达变化特点。其中, 精巢中 FSHR mRNA 表达量 3 月份时最低, 12 月份时达到峰值。从精巢发育的角度看, FSHR mRNA 的表达则是随着精子发生逐渐增多, 在精巢发育成熟(期), 即排精时表达量达到最大, 排精后降到最低值, 这与舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)中 FSHR 基因的表达模式相类似(Sambroni *et al*, 2007; Rocha *et al*, 2009); 与此相反, 在雄性黄带鲷(*Seriola quinqueradiata*)中, FSHR 表达量在精子发生早期时表达量较高, 排精时表达量反而下降(Rahman *et al*, 2003)。由此推测雄性半滑舌鲷 FSHR 基因与精巢发育整个过程密切相关, 尤其对半滑舌鲷精子的成熟和排放发挥重要作用, 说明了 FSHR 对精巢发育和成熟起调控作用。半滑舌鲷 LHR 基因在精巢中的表达特点与 FSHR 有所差异, LHR mRNA 在 6 月时表达量最少, 此时精巢处于期。随着精子的发生表达量增加, LHR mRNA 表达量在半滑舌鲷精巢发育到期时达到最大值, 这与舌齿鲈、虹鳟和黄带鲷中研究结果相类似(Kusakabe *et al*, 2006; Sambroni *et al*, 2007; Rahman *et al*, 2003; Rocha *et al*, 2009), 说明半滑舌鲷 LHR 参与雄鱼精巢的发育过程, 对雄鱼的性腺成熟和精子形成起重要的作用。比较半滑舌鲷精巢中 LHR 和 FSHR 的表达模式, 发现两者基本一致, 都是在精巢发育到期时表达量达到峰值, 表明这两种受体对促进半滑舌鲷雄鱼配子的生成和精子排放均起重要作用, 至于哪种受体起更重要的作用, 还需要进一步研究。

最近, 有研究报道垂体外其它组织能产生和释放原先只在垂体中生成的促性腺激素及其受体, 如罗非鱼的脑能分泌 FSH 和 LH (Parhar *et al*, 2003), 脑分泌的促性腺激素可能对下丘脑-垂体-性腺轴的功能有调节作用(丁福红等, 2010), 至于调节机制等还没有深入研究(Levavi-Sivan *et al*, 2010)。本文中 FSHR 基因在雄性半滑舌鲷脑中具有规律的表达特点, FSHR mRNA 在脑中表达模式与其在精巢中表达完全相反, 在 3 月份精巢处于退化吸收期时表达量最高, 到 12 月份精子成熟时达到最低值, 半滑舌鲷脑中的 FSHR 基因表达可能是通过与促性腺激素的相互作用, 利

用脑-垂体-性腺轴参与对半滑舌鲷精巢发育的一种调控, 至于调控的具体作用机制有待于进一步验证。

FSHR 和 LHR 基因在雄性半滑舌鲷脾中的表达变化趋势则与其在精巢中的表达相似, 都是在排精时达到最大值, 说明雄鱼脾中促性腺激素受体的表达变化可能与精巢的发育相关, 这揭示非性腺组织中促性腺激素及其受体的相互作用可能也会通过某种途径影响精巢发育与排精作用, 作用机制有待于进一步研究。

本文首次研究了促性腺激素受体(FSHR 和 LHR)基因在雄性半滑舌鲷精巢、脑和脾中的季节表达变化特点, 探讨了 FSHR 和 LHR 基因 mRNA 在半滑舌鲷雄鱼繁殖周期中可能具有的作用, 以期能够为进一步揭示促性腺激素及其受体作用机制提供科学理论依据。

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 GnRHa 诱导对其组成的影响. 海洋与湖沼, 41(6): 857—861
- 孙业盈, 张全启, 齐 洁等, 2008. 半滑舌鲷 DMRT1 基因的克隆与表达分析. 武汉大学学报(理学版), 54(2): 221—226
- 林浩然, 1999. 鱼类生理学. 广州: 广东高等教育出版社, 146—202
- Ascoli M, Fanelli F, Segaloff D L, 2002. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. Endocr Rev, 23: 141—174
- Hirai T, Oba Y, Nagahama Y, 2002. Fish gonadotropin receptors: molecular characterization and expression during gametogenesis. Fisheries Sci Suppl, 68: 675—678
- Kobayashi T, Pakarinen P, Torgersen J *et al*, 2008. The gonadotropin receptors FSH-R and LH-R of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)-2. Differential follicle expression and asynchronous oogenesis. General and Comparative Endocrinology, 156: 595—602
- Kumar R S, Ijiri S, Trant J M, 2001a. Molecular biology of the channel catfish gonadotropin receptors: 2. Complementary DNA cloning, functional expression, and seasonal gene expression of the follicle-stimulating hormone receptor. Biol Reprod, 65: 710—717
- Kumar R S, Ijiri S, Trant J M, 2001b. Molecular biology of channel catfish gonadotropin receptors: 1. Cloning of a functional luteinizing hormone receptor and preovulatory induction of gene expression. Biol Reprod, 64: 1010—1018
- Kusakabe M, Nakamura I, Evans J *et al*, 2006. Changes in mRNAs encoding steroidogenic acute regulatory protein, steroidogenic enzymes and receptors for gonadotropins during spermatogenesis in rainbow trout testes. J Endocrinol, 189: 541—554
- Kwok H F, So W K, Wang Y *et al*, 2005. Zebrafish gonadotropins and their receptors: I. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors-evidence for their distinct functions in follicle development. Biol Reprod, 72: 1370—1381
- Levavi-Sivan B, Bogerd J, Mañanós E L *et al*, 2010. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. General and Comparative Endocrinology, 165: 412—437
- Maugars G, Schmitz M, 2006. Molecular cloning and characterization of FSH and LH receptors in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). General and Comparative Endocrinology, 149: 108—117
- Parhar I, Soga T, Ogawa S *et al*, 2003. FSH and LH-b subunits in the preoptic nucleus: ontogenic expression in teleost. Gen Comp Endocrinol, 132: 369—378
- Rahman M A, Ohta K, Yamaguchi A *et al*, 2003. Gonadotropins, gonadotropin receptors and their expressions during sexual maturation in yellowtail, a carangid fish. Fish Physiol Biochem, V28: 81—83
- Rocha A, Gómez A, Zanuy S *et al*, 2007. Molecular characterization of two sea bass gonadotropin receptors: cDNA cloning, expression analysis, and functional activity. Molecular and Cellular Endocrinology, 272: 63—76
- Rocha A, Zanuy S, Carrillo M *et al*, 2009. Seasonal changes in gonadal expression of gonadotropin receptors, steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenic enzymes in the European sea bass. General and Comparative Endocrinology, 162: 265—275
- Sambroni E, Le Gac F, Breton B *et al*, 2007. Functional specificity of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gonadotropin receptors as assayed in a mammalian cell line. Journal of Endocrinology, 195: 213—228
- Schulz R W, Vischer H F, Cavaco J E B *et al*, 2001. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 129: 407—417
- Swanson P, Dittman A, 1997. Pituitary gonadotropins and their receptors in fish. In: Kawshima S, Kikuyama S ed. Advances in Comparative Endocrinology. Monduzzi Editore, Bologna, 841—856
- Themmen A P N, Huhtaniemi I T, 2000. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. Endocr Rev, 21: 551—583
- Vassart G, Pardo L, Costagliola S, 2004. A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors. Trends Biochem Sci, 29: 119—126
- Vischer H F, Granneman J C M, Linskens M H K *et al*, 2003. Both recombinant African catfish LH and FSH are able to activate the African catfish FSH receptor. J Mol Endocrinol, 31: 133—140

EXPRESSION ANALYSIS OF FSHR AND LHR mRNAs DURING THE REPRODUCTIVE CYCLE OF MALES *CYNOGLOSSUS SEMILAEVIS* GÜNTHER

CHEN Xiao-Yan, WEN Hai-Shen, HE Feng, LI Ji-Fang, CHEN Cai-Fang, ZHANG Jia-Ren,
JIN Guo-Xiong, SHI Bao, SHI Dan, YANG Yan-Ping

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

Abstract This paper focus on the study of the seasonal expression changes of gonadotropin receptors (FSHR and LHR) in reproductive cycle of male Half-smooth tongue sole using reverse-transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR). The results showed there were seasonal changes of expression of FSHR in testis, brain, and spleen and expression of LHR in testis and spleen. In testis, FSHR transcripts expressed at the lowest level in March and the highest in December. Interestingly, a reverse FSHR transcripts expression profiles was found for brain, the highest in March and the lowest in December. And there was a similar expression pattern for FSHR transcripts expressed in spleen and testis. For LHR transcripts, the highest level was found in December and the lowest in June for testis; the lowest level was found in March and the highest in December for spleen. As a whole, the transcript levels of FSHR and LHR at the highest during sperming, and these indicate that both kinds of gonadotropin receptors play important roles at sperming of male Half-smooth tongue sole.

Key words *Cynoglossus semilaevis* Günther, Follicle-stimulating hormone receptor (FSHR), Luteinizing hormone receptor (LHR), Gene expression, Testis, Brain, Spleen