

# 盐度调控对花鲈(*Lateolabrax maculatus*)生长 相关基因表达的影响\*

张 沛 迟美丽 温海深 钱 焜 倪 蒙  
张亚晨 黄政举 宋志飞 柴森浩

(中国海洋大学水产学院 青岛 266003)

**摘要** 生长激素受体(GHR)作为 GH/IGF 轴的中心环节,在内分泌调控中发挥重要作用。本实验采用 cDNA 末端快速扩增法(RACE)技术克隆出花鲈 GHR1 和 GHR2 的 cDNA 全长序列。急性低盐度调控实验设为海水组、半海水组和淡水组。测定了急性低盐度调控 24、48、96、144、192h 后,花鲈肝脏中 GHRs、IGF-1 及垂体 GH 表达情况。结果表明, GHR1 cDNA 全长序列 2436bp, 编码 637 个氨基酸; GHR2 cDNA 全长序列 2940bp, 编码 582 个氨基酸。GHR1 与 GHR2 由信号肽、胞外区、跨膜区、胞内区组成,且结构存在差异。脑、肾、鳃中 GHR1 表达明显高于 GHR2;而在肌肉、垂体、肝脏、盲肠、胸腺、心脏中, GHR2 表达明显高于 GHR1。24h 时,各组 GHR1 表达不变, GHR2、GH、IGF-1 显著下降。之后,相对于海水组,淡水组和半海水组 GHRs 和 IGF-1 表达升高,而 GH 下降, GH 与 GHR 负相关。据结果推测,花鲈 GHR2 可能为 SL 受体, GH/IGF 轴参与低渗调控可能是通过增加 GHRs, 进而激活下游 IGF-1 表达而实现。

**关键词** 花鲈; 盐度; 生长激素受体; 生长激素; 胰岛素样生长因子 1

**中图分类号** S965.3 **doi:** 10.11693/hyhz20140400102

生长激素受体(growth hormone receptor, GHR)是一种单链跨膜糖蛋白,属于细胞因子/红细胞生成素受体超家族,结构分为胞外区、跨膜区和胞内区。哺乳动物中仅鉴定出一种 GHR,而鱼类中 GHR 主要分为 GHR1 和 GHR2 两种亚型。近年来,系统进化分析及结合实验研究表明, GHR1 可能为生长催乳素受体(somatolactin receptor, SLR), GHR2 才是生长激素(growth hormone, GH)真正的受体(Fukamachi *et al.*, 2005, 2007)。玉丽体鱼(*Cichlasoma dimerus*) (Rhee *et al.*, 2012)和莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*) (Pierce *et al.*, 2007)研究也表明 GHR1 实际为 SLR。生长催乳素由腺垂体分泌,为鱼类特有激素,属于生长激素家族。动物生长发育可通过 GH/IGF 轴介导。GH 是由生长激素释放激素诱导垂体分泌的蛋白类激素。

GH 与靶细胞表面生长激素受体(GHR)结合,通过 JAK2/STAT 信号转导途径,激发靶细胞合成胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF),再通过血液循环到达靶组织,促进细胞生长和分化。GHR 为 GH/IGF 轴中心环节,在生长内分泌调控中发挥重要作用。GH 在高渗适应中有重要作用(McCormick, 2001),研究表明 GH 可参与渗透压调控,环境盐度变化可改变垂体 GH 细胞数量及血浆 GH 浓度,且这种改变存在种间差异(Mancera *et al.*, 1998)。急性高盐度刺激可上调巴西牙鲆(*Paralichthys orbignyanus*)GH、GHR 和 IGF-1 基因转录(Meier *et al.*, 2009)。

高盐度可促进虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) GHR1 mRNA 表达,进而提高鳃中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶 1a mRNA 水平(Flores *et al.*, 2012)。GH 转基因斑马鱼

\* 国家“十二五”国家科技支撑计划重大项目课题, 2011BAD13B03 号。张沛, 硕士, E-mail: pei325@126.com

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

收稿日期: 2014-04-04, 收修改稿日期: 2014-09-17

(*Danio rerio*)的高渗及代谢调节能力显著提升(Daniela *et al*, 2013)。盐度升高可提高尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)血浆 GH, 进而提高 GHR mRNA 水平, 而莫桑比克罗非鱼无变化(Breves *et al*, 2010)。低渗适应是否受 GH/IGF 轴信号通路调控研究较少, 且 GHR 可能的渗透压调控作用是否通过上下游的 GH 和 IGF 介导尚有待探明。

花鲈(*Lateolabrax maculatus*)为东北亚特有种类, 主要分布于中国、日本、朝鲜沿海, 属广温广盐性浅海近岸中下层鱼类, 为我国南、北方重要的网箱与池塘养殖经济鱼类之一(张美昭等, 2001)。花鲈因其肉质鲜美, 颇受消费者的喜爱, 社会需求日益增加。目前, 花鲈形态学、饲料与养殖技术方面研究较多, 而盐度对花鲈生理影响的研究较少。杜涛等(2013)研究了不同盐度下 1 龄花鲈生长特性的差异, 表明其最适生长盐度为 16—17, 而花鲈盐度调控生理分子机制研究尚未见报道。我国沿海花鲈产量有限, 且南方沿海网箱养殖的花鲈种质退化, 抗病力降低, 花鲈淡水养殖有待研究。内陆多地开始探索淡水养殖花鲈。而淡水驯化将引起花鲈内分泌改变。GHR 作为调控生长的 GH/IGF 轴重要的中间环节, 在生长内分泌调控中发挥重要作用。然而, 有关 GHR 在渗透压调控中的作用研究较少。

本研究克隆得到花鲈 GHR1 和 GHR2 基因, 并对其序列进行分析, 探究了低盐度调控后 GHRs 及上下游基因 GH 和 IGF-1 表达差异, 旨在为研究花鲈 GH/IGF 轴在盐度适应中的功能奠定基础, 同时为花鲈淡水驯化养殖提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及处理

从山东省青岛市胶南近海网箱养殖的同规格、健康花鲈 78 尾, 平均体重为(803.5 ± 49.8)g, 平均体长为(40.5 ± 1.4)cm。在实验室水族箱中海水暂养, 期间禁食。实验用海水为沙滤自然海水(盐度 32), 淡水为曝气后自来水, 实验温度为(17.5 ± 0.4)°C。暂养 3d 后进行实验。首先取 6 尾作为实验原点, 实验分为 3 组: 海水组、半海水组和淡水组, 每组设 4 个平行水族箱(0.6 × 0.8 × 1.0)m<sup>3</sup>, 每个水族箱放养 6 尾花鲈。海水组盐度不变; 半海水组和淡水组每 12h 盐度分别降低 4、8, 降至 16、0 后保持稳定。每天 9:00 和 21:00 各换水 3/4, 各盐度实验用水以海水和淡水按比例混匀

调温后加入水族箱。24、48、96、144、192h 时, 每实验组随机选 4 尾, 早晨 8:00 采样, MS-222 麻醉解剖取 14 个组织(肠、脾、肌肉、心脏、胃、精巢、肝脏、鳃、脑、盲肠、头肾、肾、胸腺、垂体), 样品液氮冷冻后-80°C 冰箱保存。

### 1.2 花鲈 GHRs cDNA 克隆

取花鲈肝脏, Trizol 法提取总 RNA, Biodropsis BD-1000 核算测定仪测定 RNA 的浓度, 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。用 PrimerScript RT reagent Kit 试剂盒反转录成 cDNA 后-80°C 冰箱保存。取肝脏总 RNA, 用 Smart<sup>TM</sup> Race cDNA Amplification kit 试剂盒, 依说明书合成全长克隆 cDNA 模板。

参照近缘鱼类 GHRs 氨基酸序列, 用 CODEHOP 设计简并引物(表 1)。片段克隆 PCR 反应: 94°C 预变性 5 min; 94°C30s, T<sub>m</sub> 30s, 72°C60s, 35 个循环; 72°C10 min。1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物;

表 1 花鲈基因克隆与荧光定量引物  
Tab.1 Primers used for cloning and qPCR of seabass

Primers	Sequences (5'—3')	T <sub>m</sub> (°C)
Fragment		62
GHR1F	GTRCACATCMGCTGCAGGATG	
GHR1R	TGAGTTGCYKCCAGGAGAC	
GHR2F	GRWSACKTTCCGCTGCAGATG	60
GHR2R	TCRATGAAYTCCACCCAGGG	
5'RACE		
GHR1F1	GGAAGGCATCACATTGCTGACCTGGGC	68.1
GHR1F2	AATCTGTGCTGCTGAGAGACGACAATGAG	64.9
GHR2F1	GCCACTAAACACAAGGCACCAAAGACGAGC	67.5
GHR2F2	GCAGCGTCATCCATCCCATCTCCACATC	67.9
3'RACE		
GHR1R1	CATCCTGAGTGGTGGAGGTATGGGTGGC	69.3
GHR1R2	CAGACTTCTATGCCAGGTCAGCAATGTG	66.3
GHR2R1	ACTGGACGCTGCTGAACGTGAGTTTGACC	67.7
GHR2R2	GAGTCCGCAGATGTGGAGATGGGATGG	68.1
qPCR		
qGHR1F	GGGTGGCCTACCGTCTTATG	60
qGHR1R	CCCTGGTTGTCTCTCTCTCT	
qGHR2F	TGTGGAGATGGGATGGATG	60
qGHR2R	CGACACTTTAGACGGGATGA	
qGHF	GTTCTCTGTCTGGCGGTTT	58
qGHR	CCTGTGTCATGTCTTTTTTG	
qIGF-1F	CGCAATGGAACAAAGTCGGAATAT	62
qIGF-1R	GTGAGAGGGTGTGGCTACAGGAGA	
q-actinF	CAACTGGGATGACATGGAGAAG	60
q-actinR	TTGGCTTTGGGGTTTCAGG	

SAGECREATION 电泳凝胶成像系统分析获得目的条带, 目的片段产物利用 TIANGel Midi Purification kit 进行凝胶回收; 连接 pEASY-T<sub>1</sub> 载体; 转化到 Trans-T<sub>1</sub> 感受态细胞; 氨苄抗性固体培养基 37°C 过夜培养; 挑菌以氨苄抗性液体培养基培养; 菌体 PCR 检测; 阳性菌液送北京华大基因科技公司测序。

用 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒扩增 5'端和 3'端。据获得 GHRs 片段, 用 Primer5 设计与试剂盒中 UPM 匹配引物(表 1), RACE PCR 反应程序参照试剂盒说明。RACE PCR 产物测序同片段克隆。DNAMAN 拼接基因获得基因全长。

### 1.3 GHRs 基因序列分析

用 DNAMAN 预测开放阅读框并推测氨基酸序列, 用 Signal P 4.1 server 分析信号肽; 用 Scratch 程序预测二硫键。预测的氨基酸序列在 NCBI 进行 Blast 搜索, 用 DNAMAN 将其与其它物种 GHRs 氨基酸序列进行多重序列比对。选取部分物种 GHRs 氨基酸序列, 用 Clustal X 和 MEGA 4.0 软件, 以邻接法(Neighbour-Joining, NJ)构建系统进化树。用 DNAMAN 进行同源性分析。

### 1.4 GHRs、IGF-1、GH 荧光实时定量 PCR

据花鲈 GHRs、GH (GenBank: L43629)和 IGF-1 (GenBank: JQ327805)cDNA 序列设计表达引物(表 1)。以 *-actin* 为内参基因, 检测花鲈 14 个组织中 GHRs 表达水平, 并检测实验各组肝脏中 GHR1,2, IGF-1 和垂体中 GH 表达水平。用 SYBR Green Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (Tli RNaseH Plus)试剂盒, 在 ABI step one plus 实时定量 PCR 仪上进行反应, 实验设 3 个重复。各基因荧光定量采用两步法, PCR 程序: 94°C 30s, 94°C 5s,  $T_m$  30s, 40 个循环; 溶解步骤。用  $2^{-C_t}$  法处理各基因荧光定量所得数据, 并分析扩增效率。

### 1.5 数据分析

实验数据用平均值  $\pm$  标准误(Mean  $\pm$  SEM)表示, SPSS 19.0 进行单因素方差分析, 进行 Duncan's 多重比较, 当  $P < 0.05$  时, 表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 花鲈 GHR1、GHR2 cDNA 结构分析

克隆得到花鲈 GHR1 cDNA 全长序列 2436bp, 其中编码区 1911bp, 编码 637 个氨基酸; GHR2 cDNA 全长序列 2940bp, 其中编码区 1746bp, 编码 582 个氨基酸。序列已经提交到 GenBank: GHR1, KF601961; GHR2, KF770840。GHRs 氨基酸序列结构及多序列比

对分析如图 1 所示。花鲈 GHRs 由信号肽、胞外区、跨膜区、胞内区组成。前端信号肽氨基酸, GHR1 为 28 个, GHR2 为 19 个。胞外区在靠近跨膜区的位置有一个保守的区域, GHR1 中为 FGEFS, GHR2 中为 FGGFS。胞外区半胱氨酸残基, GHR1 有 7 个, GHR2 有 6 个。胞外糖基化位点, GHR1 有 6 个, GHR2 有 4 个。跨膜结构域氨基酸同源性较低。胞内区有保守 Box1 和 Box2。胞内酪氨酸残基, GHR1 有 8 个, GHR2 有 4 个。胞外半胱氨酸残基位点(GHR1: 1、2、3、4、5、6、8, GHR2: 1、2、3、4、7、8)。胞外糖基化位点(GHR1: 1、3、4、5、6、7, GHR2: 1、2、5、6)。胞内酪氨酸残基位点(GHR1: 1、2、3、4、5、6、7、8, GHR2: 2、4、5、8)。GHRs 氨基酸系统进化分析如图 2 所示, 硬骨鱼类 GHR1 为一支, 硬骨鱼类 GHR2 为一支, 而达氏鳢与高等脊椎动物为一支。系统进化树符合物种间传统分类地位。花鲈 GHR1 与 GHR2 间氨基酸序列同源性为 36.09%。

### 2.2 GHRs mRNA 组织表达模式

花鲈各组织表达结果如图 3 所示, 14 个组织中均检测到 GHRs mRNA 表达, 但 GHR1 和 GHR2 组织分布存在差异。GHR1 在脑中表达最高, 其次为垂体、胃、肝脏、肾、盲肠、鳃、心脏, 在肠、头肾、胸腺、脾、肌肉、精巢中表达较低。GHR2 在肌肉中表达最高, 其次为垂体、肝脏、盲肠、心脏、胸腺、胃, 在肠、脑、肾、脾、鳃、头肾、精巢中表达较低。其中, 脑、肾、鳃中 GHR1 表达明显高于 GHR2; 而在肌肉、垂体、肝脏、盲肠、胸腺、心脏中, GHR2 表达明显高于 GHR1。

### 2.3 低盐度调控花鲈 GHRs、IGF-1、GH 表达规律

本实验检测了急性低盐度调控后花鲈肝脏中 GHR1、GHR2 和 IGF-1 及垂体中 GH 的转录水平(图 4)。24h 时, 各组 GHR1 保持稳定, 而 GHR2、GH、IGF-1 显著下降。淡水组和半海水组 GHR1 mRNA 在 96h 后均显著高于海水组。且在 96h 和 192h 时, 淡水组 GHR1 显著高于半海水组。淡水组 GHR2 mRNA 在 96h 后显著高于海水组和半海水组, 半海水组 GHR2 mRNA 在 144h 后显著高于海水组, 且在 144h 和 192h 淡水组与半海水组间无显著差异。淡水组 GH mRNA 在 96h 后显著低于海水组, 半海水组 GH mRNA 在 144h 后显著高于海水组, 且在 144h 和 192h 淡水组与半海水组间无显著差异。淡水组 IGF-1 mRNA 在 192h 显著高于海水组和半海水组, 半海水组 IGF-1 mRNA 在 144h 和 192h 显著高于海水组和淡水组, 且在 192h 时淡水组与半海水组间无显著差异。



图 1 GHRs 氨基酸多序列比对

Fig.1 Multiple sequence alignment of GHRs

虚线箭头: 信号肽; 三角形: 半胱氨酸残基; 正方形: 糖基化位点; 实线方框: 胞外保守 motif; 上划实线: 跨膜结构域; 虚线方框: 胞内保守 Box; 圆点: 酪氨酸残基。GenBank: 花鲈 GHR1 (*Lateolabrax maculatus*, AGZ80756), 红鳍东方鲀 GHR1 (*Takifugu rubripes*, BAK86396), 日本鳗鲡 GHR1 (*Anguilla japonica*, BAD20706), 花鲈 GHR2 (*Lateolabrax maculatus*, AHG94936), 红鳍东方鲀 GHR2 (*Takifugu rubripes*, BAK86397), 日本鳗鲡 GHR2 (*Anguilla japonica*, BAD20707), 达氏鳢 GHR (*Huso dauricus*, ABO70345), 中华鳖 GHR (*Pelodiscus sinensis japonicus*, AAG43525), 非洲爪蟾 GHR (*Xenopus laevis*, AAI70238), 鸡 GHR (*Gallus gallus*, AGG38007), 人 GHR (*Homo sapiens*, AAA52555)

### 3 讨论

#### 3.1 花鲈 GHRs 结构及组织分布

首次克隆得到花鲈 GHR1 与 GHR2 基因, 并研究了二者差异。GHR1 与 GHR2 间氨基酸序列结构上存在差异。胞外半胱氨酸残基数 GHR1 比 GHR2 多一

个, 两基因在 5 个位点半胱氨酸残基保持一致, 在 3 个位点存在差异, 而多序列比对显示物种间共 4 个半胱氨酸残基位点高度保守, 不同位点半胱氨酸残基构成二硫键不同, 可能改变空间结构, 造成功能差异。胞外 N-糖基化位点 GHR1 比 GHR2 多 2 个, 这种不同可能造成 GHRs 在信号转导过程中的差异。

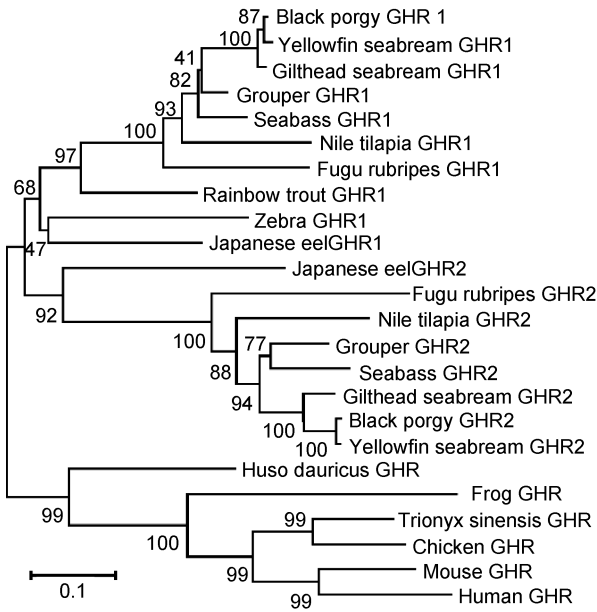


图2 GHRs 氨基酸 N-J 系统进化树

Fig.2 The Neighbor-joining tree of deduced amino acid sequences of GHRs

GenBank: 黑鲟 GHR1 (*Acanthopagrus schlegelii*, AAN77286), 黄鳍鲷 GHR1 (*Acanthopagrus latus*, AEW29011), 金头鲷 GHR1 (*Sparus aurata*, AAM00431), 斜带石斑鱼 GHR1 (*Epinephelus coioides*, ABM21632), 花鲈 GHR1 (*Lateolabrax maculatus*, AGZ80756), 尼罗罗非鱼 GHR1 (*Oreochromis niloticus*, ABK41365), 红鳍东方鲷 GHR1 (*Takifugu rubripes*, BAK86396), 虹鳟 GHR1 (*Oncorhynchus mykiss*, AFC87830), 斑马鱼 GHR1 (*Danio rerio*, NP\_001077047), 日本鳗鲡 GHR1 (*Anguilla japonica*, BAD20706), 日本鳗鲡 GHR2 (BAD20707), 红鳍东方鲷 GHR2 (BAK86397), 尼罗罗非鱼 GHR2 (ABK41366), 斜带石斑鱼 GHR2 (ABM21633), 花鲈 GHR2 (AHG94936), 金头鲷 GHR2 (AAT76436), 黑鲟 GHR2 (AAV83932), 黄鳍鲷 GHR2 (AEW29012), 达氏鳊 GHR (*Huso dauricus*, ABO70345), 非洲爪蟾 GHR (*Xenopus laevis*, AAI70238), 中华鳖 GHR (*Pelodiscus sinensis japonicus*, AAG43525), 鸡 GHR (*Gallus gallus*, AGG38007), 鼠 GHR (*Mus musculus*, EDL03404), 人 GHR (*Homo sapiens*, AAA52555)

BOX1 富含脯氨酸(P), 在整个信号转导过程起关键作用; Box2 是与受体的内化作用相关。多序列比对表明物种间 BOX1 序列同源性较高, 而 Box2 保守性较差。胞内酪氨酸残基, GHR1 有比 GHR2 多 4 个, 酪氨酸残基的磷酸化作用可为信号传导提供停靠位点 (Wang *et al*, 1996)。因此, GHRs 胞内酪氨酸数目的差异可能影响 GH 与 GHRs 结合。多物种间 GHRs 氨基酸序列比对表明 GHRs 相对保守性存在较大的种间差异, 物种间 GHRs 功能是否存在差异有待研究。花鲈 GHR1 与 GHR2 同源性仅为 30.09%。黄鳍鲷(*Sparus latus*)GHR1 与 GHR2 间同源性为 36.7%(马细兰等, 2011)。而鱼类种间 GHR1 同源性和种间 GHR2 同源性均较高, 表明 GHR1 和 GHR2 在进化中差异较大。

进化树分析显示, 硬骨鱼类 GHR1 和 GHR2 分为明显的两支, 表明种内 GHRs 亚型间差异较大, 而种间 GHRs 差异较小。硬骨鱼 GHR2 与高等动物 GHR 亲缘关系较近, 暗示 GHR2 为鱼类 GH 受体, 而鱼类 GHR1 可能为 SL 受体。鱼类 GHRs 的确定尚需从更多鱼类中验证。

花鲈 GHR1 和 GHR2 组织分布不同, 推测其功能可能存在差异。脑、鳃和肾中 GHR1 显著高于 GHR2, 而鳃和肾是重要的渗透压调节器官, 推测 GHR1 可能更多地参与渗透压调控; 脑中高表达, 推测其负反馈调控中枢可能在下丘脑。肌肉、心脏、肝脏、盲肠、胸腺和垂体中 GHR2 高于 GHR1, 而这些均为 GH/IGF 轴中重要的功能器官, 推测 GHR2 更多在生长方面发挥重要作用。此外, 斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*) (Li *et al*, 2007)、黄鳍鲷(马细兰等, 2011)、黑鲟 (*Acanthopagrus schlegelii*) (Jiao *et al*, 2006)、尼罗

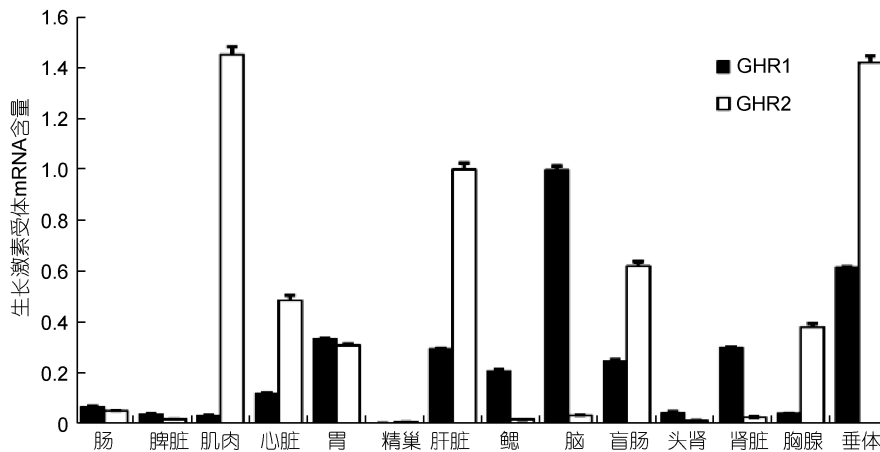


图3 花鲈各组织 GHRs mRNA 相对表达量

Fig.3 Relative expression levels of GHRs mRNA in tissues of seabass

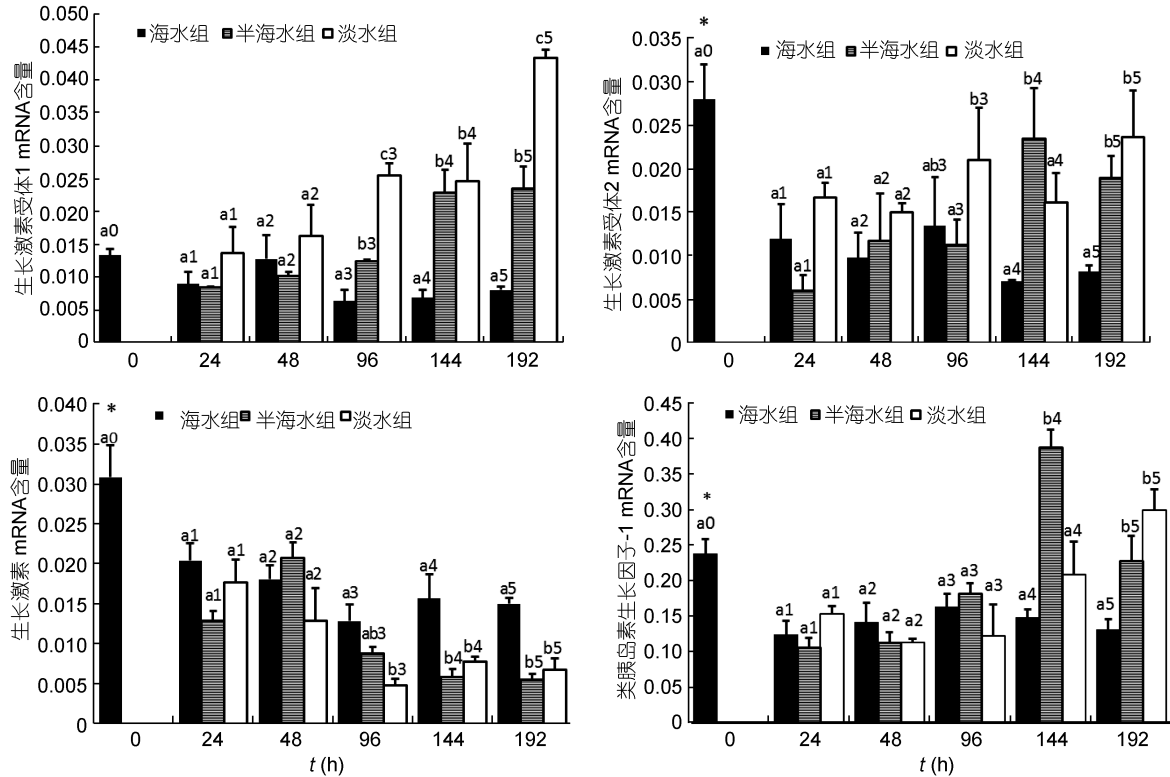


图4 肝脏 GHR1、GHR2 和 IGF-1 及垂体 GH 相对表达量

Fig.4 Relative mRNA expression of GHR1, GHR2, IGF-1 in live and GH in pituitary

罗非鱼(Ma *et al*, 2007)等鱼类研究同样表明了 GHR1 与 GHR2 的组织分布存在差异, 且存在种间特异性。

### 3.2 低渗调控花鲈 GH/IGF 轴表达改变

本实验中 24h 时, 各组 GHR1 表达保持稳定, 而 GHR2、GH、IGF-1 显著下降。有研究表明慢性胁迫及外源皮质醇(Cortisol, Cor)处理可以大幅降低鱼体生长率(Mommsen *et al*, 1999), 这可能包含皮质醇与 GH/IGF 轴间的交互作用。Peterson 等(2005)报道, 高水平外源 Cor 可降低斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)垂体 GHmRNA 表达。许多调控因素都可升高鱼体 Cor, 即使是对照组也经常检出高的 Cor 水平(Hori *et al*, 2008; LeBlanc *et al*, 2011)。推测实验组鱼体受低渗透诱导后, 可能会出现高 Cor 水平, 抑制 GH 表达, 进而抑制 GHR2 表达降低, 但未引起 GHR1 表达改变。在 24h 时, 低渗调控可能抑制了 GH/IGF 轴表达。据此推测, IGF-1 表达降低可能是通过 GH 对 GHR2 的调控通路实现的, 同时暗示了 GHR2 可能为 GH 的真正受体。

24h 后, 相对于海水组, 淡水组和半海水组 GHRs 和 IGF-1 表达随调控时间而升高, 而 GH 则表现出下降趋势。哺乳动物研究中, 小鼠(*Mus musculus*)肾脏

(Butler *et al*, 1996)和鸡(*Gallus gallus*)肝脏(Mao *et al*, 1997)中发现 GH 与 GHR 负相关。鱼类中, 莫桑比克罗非鱼在低渗适应中也发现 GH 与 GHR 负相关(Pierce *et al*, 2007)。GH 与 GHRs 间关系较为复杂, 可能受其它因素干扰。罗非鱼进行 Cor 注射后, 其肝脏 IGF-1 表达降低, 并呈现出剂量依赖性, 而血浆 GH 含量未改变, 表明 Cor 可能造成 GH 抵抗(Kajimura *et al*, 2003)。因此, GHRs 变化, 可能是通过改变 GHR 对 GH 反应的敏感性。此外, GHRs 改变也可能并非仅有 GH 诱导一种途径, 而是通过其它因子介导调控。据此推测, 低渗调控可激活 GHRs 转录, 而 GHRs 的增加并非通过 GH 对 GHRs 诱导表达来实现, 可能是低渗调控直接诱导上调了 GH 与 GHR 的结合敏感性或通过其它因子介导实现增加 GHRs 转录, 进而激活下游 IGF-1 表达, 增强低渗调节能力。GH 的渗透调节能力有可能是通过渗透调控诱导 GHRs 表达, 并激活下游通路来实现。花鲈渗透调节能力可能是通过增加 GHRs 而增加的。

此外, 在实验后期, 淡水组 GHRs 和 IGF-1 表达要高于海水组, 而淡水组 GH 含量要低于半海水组。半海水组盐度理论上为花鲈生长最适宜盐度。如果仅

从生长方面分析,半海水组 GH/IGF 轴中各因子应表现出更高的含量,但实验中检测到可反映其更适宜花鲈生长的 GH/IGF 轴指标。据此推测,可能是急性的低渗调控占主导作用,实验中花鲈尚未能完全适应盐度改变, GH/IGF 轴的生长调控功能尚未恢复到正常水平。

本研究克隆出花鲈 GHR1 和 GHR2 基因,并探究了低盐度调控后 GH/IGF 轴部分相关基因的表达情况。同时,对 GH/IGF 轴在花鲈低渗调控中的作用进行分析,而更为系统的调控机制有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- 马细兰,冷婷婷,刘启智等,2011. 黄鳍鲷(*Sparus latus*)两种生长激素受体的 cDNA 克隆及组织表达分析. 海洋与湖沼, 42(2): 830—838
- 杜涛,黄洋,覃雪迎等,2013. 不同盐度养殖龄花鲈(*Lateolabrax japonicus*)的生长特性差异分析. 海洋与湖沼, 44(2): 337—341
- 张美昭,高天翔,2001. 花鲈亲鱼人工培育与催产技术研究. 青岛海洋大学学报, 31(2): 195—200
- Breves J P, Hasegawa S, Yoshioka M *et al*, 2010. Acute salinity challenges in Mozambique and Nile tilapia: Differential responses of plasma prolactin, growth hormone and branchial expression of ion transporters. *General and Comparative Endocrinology*, 167: 135—142
- Butler A A, Funk B, Breier B H *et al*, 1996. Growth hormone (GH) status regulates GH receptor and GH binding protein mRNA in a tissue and transcripts specific manner but has no effect on insulin-like growth factor-I receptor mRNA in the rat. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 116: 181—189
- Daniela V A, Camila M G M, Márcio A F *et al*, 2013. Growth hormone transgenesis affects osmoregulation and energy metabolism in zebrafish (*Danio rerio*). *Transgenic Research*, 22: 75—88
- Flores A M, Shrimpton J K, 2012. Differential physiological and endocrine responses of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, transferred from fresh water to ion-poor or salt water. *General and Comparative Endocrinology*, 175: 244—250
- Fukamachi S, Meyer A, 2007. Evolution of receptors for growth hormone and somatolactin in fish and land vertebrates: lessons from lungfish and sturgeon orthologues. *Journal of Molecular Evolution*, 65: 359—372
- Fukamachi S, Yada T, Mitani H, 2005. Medaka receptors for somatolactin and growth hormone: phylogenetic paradox among fish growth hormone receptor. *Genetics*, 171: 1875—1883
- Hori T S F, Avilez I M, Iwama G K, *et al*, 2008. Impairment of the stress response in matrinxá juveniles (*Brycon amazonicus*) exposed to low concentrations of phenol. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 147C: 416—423
- Jiao B W, Huang X G, Chan C B *et al*, 2006. The co-existence of two growth hormone receptors in teleost fish and their differential signal transduction, tissue distribution and hormonal regulation of expression in sea bream. *Journal of Molecular Endocrinology*, 36(1): 23—40
- Kajimura S, Hirano T, Visitacion N *et al*, 2003. Dual mode of cortisol action on GH/IGF-I/IGF binding proteins in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Endocrinology*, 178: 91—99
- LeBlanc S, Middleton S, Gilmour K M *et al*, 2011. Chronic social stress impairs thermal tolerance in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology*, 214: 1721—1731
- Li Y, Liu X, Zhang Y *et al*, 2007. Molecular cloning, characterization and distribution of two types of growth hormone receptor in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *General and Comparative Endocrinology*, 152: 111—122
- Ma X, Liu X C, Zhang Y *et al*, 2007. Two growth hormone receptors in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): molecular characterization, tissue distribution and expression profiles during different gonad developing stages. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 147(2): 325—339
- Mancera J M, McCormick S D, 1998. Osmoregulatory actions of the GH/IGF axis in non-salmonid teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 121: 43—48
- Mao J N, Cogburn L A, Burnside J, 1997. Growth hormone downregulates growth hormone receptor mRNA in chickens but developmental increases in growth hormone receptor mRNA occur independently of growth hormone action. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 129: 135—143
- McCormick S D, 2001. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *American Zoologist*, 41: 781—794
- Meier K M, Figueiredo M A, Kamimura M T, 2009. Increased growth hormone (GH), growth hormone receptor (GHR), and insulin-like growth factor I (IGF-I) gene transcription after hyperosmotic stress in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35: 501—509
- Mommsen T P, Vijayan M M, Moon T W, 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9: 211—268
- Peterson B C, Small B C, 2005. Effect of exogenous cortisol on the GH/IGF-I/IGFBP network in channel catfish. *Domestic Animal Endocrinology*, 28: 391—404
- Pierce A L, Fox B K, Davis L K *et al*, 2007. Prolactin receptor, growth hormone receptor, and putative somatolactin receptor in Mozambique tilapia: Tissue specific expression and differential regulation by salinity and fasting. *General and Comparative Endocrinology*, 154: 31—40
- Rhee J S, Kim B M, Seo J S *et al*, 2012. Cloning of growth hormone, somatolactin, and their receptor mRNAs, their expression in organs, during development, and on salinity stress in the hermaphroditic fish, *Kryptolebias marmoratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 161: 436—442
- Wang X, Darus C J, Xu B C *et al*, 1996. Identification of growth hormone receptor (GHR) tyrosine residues required for GHR phosphorylation and JAK2 and STAT5 activation. *Molecular Endocrinology*, 10(10): 1249—1260

**CLONING OF GROWTH HORMONE RECEPTOR AND SALINITY EFFECTS ON  
THE EXPRESSION OF ITS RELATED GENES IN SEABASS  
*LATEOLABRAX MACULATUS***

ZHANG Pei, CHI Mei-Li, WEN Hai-Shen, QIAN Kun, NI Meng, ZHANG Ya-Chen,  
HUANG Zheng-Ju, SONG Zhi-Fei, CHAI Sen-Hao  
(College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract** Growth hormone receptors (GHRs) as the key part of GH/IGF axis play important roles in individual endocrine. From the cDNA sequence of seabass *Lateolabrax maculatus*, two GHRs were cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE). Acute salinity regulation experiment contained three groups: seawater, half-seawater, and freshwater. Hepatic GHRs, insulin-like growth factor (IGF-1) and hypophyseal growth hormone (GH) were determined after 24h, 48h, 96h, 144h, 192h by qPCR. GHR1 and GHR2 were 2436bp and 2940bp in length, encoding 637 and 582 amino acid, respectively. GHR1 and GHR2 contained different putative signal peptide, extracellular domain, transmembrane domain, and intracellular domain. Expression level of GHR1 was higher than GHR2's in brain, kidney and gill, but in muscle, pituitary, liver, caecum, thymus, and heart, the opposite. GHR1 mRNA was constant, while the levels of GHR2, GH, and IGF-1 decreased in 24h. Compared with seawater group, the half-seawater and freshwater groups had higher expression of GHRs, IGF-1 and lower expression of GH. Therefore, the GHR1 of seabass is probably the somatolactin receptor. GH/IGF axis participates in osmoregulation, and may improve the levels of GHRs, and further activate the expression of IGF-1.

**Key words** *Lateolabrax maculatus*; salinity; growth hormone receptor; growth hormone; insulin-like growth factor 1