

渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第38卷 VOL.38 第1期 NO.1



中国水产科学研究院黄海水产研究所 主办
中国水产学会



科学出版社 出版
Science Press

渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

第 38 卷 第 1 期

2017 年 2 月

中国科技核心期刊
中文核心期刊
全国优秀农业期刊

中国科学引文数据库(CSCD)核心库来源期刊

中国科技论文统计源核心期刊

RCCSE 中国权威学术期刊

中国期刊全文数据库(CNKI)、万方数据、

中文科技期刊数据库(维普网)收录期刊

中国海洋文献数据库(CODS)来源期刊

英国《动物学记录》(ZR)收录期刊

《水科学与渔业文摘》(ASFA)收录期刊

《剑桥科学文摘》(CSA)收录期刊

《乌利希期刊指南》(UPD)收录期刊

《开放获取期刊指南》(DOAJ)收录期刊

目 次

专辑：海水鱼类生殖与生长的生理生态学机制

- 我国鲆鲽类生殖内分泌研究进展..... 柳学周 史宝 徐永江 王滨 刘新富 孟振 (1)
- 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)新型膜孕激素受体基因(mPRL)在卵母细胞成熟过程中的表达特征..... 史宝 柳学周 徐涛 李晓妮 徐永江 张金勇 (10)
- 性成熟雌性牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)新型膜孕激素受体(mPRL)的定性定量表达分析..... 史宝 柳学周 徐涛 李晓妮 徐永江 张金勇 (18)
- 膜孕激素受体(mPR α)在半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)卵母细胞成熟过程中的表达特征..... 李晓妮 柳学周 史宝 徐永江 张金勇 (25)
- mPR α 在性成熟雌性牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)不同组织中的定性定量表达特征..... 李晓妮 柳学周 史宝 徐永江 李晓晓 张金勇 (34)
- 促性腺激素调控半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)卵母细胞孕酮受体膜组分 1 的表达特征..... 张金勇 柳学周 史宝 徐永江 (42)
- 孕酮受体膜组分 1 基因在性成熟雌性半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)的组织学定位定量分析..... 张金勇 史宝 柳学周 徐永江 (48)
- GnIH 多肽对半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)下丘脑生殖相关基因表达的影响..... 刘权 王滨 柳学周 徐永江 史宝 刘增新 (56)
- 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*) *gnrh2* 基因克隆、组织分布及卵巢成熟过程中表达分析..... 王滨 柳学周 刘权 赵明 徐永江 史宝 (63)
- GH/IGF- I 轴对半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)卵巢发育的调控作用..... 徐永江 柳学周 石莹 王滨 史宝 张凯 蓝功岗 (73)
- 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)黑色素富集激素基因的克隆和表达..... 徐永江 朱学武 柳学周 史学营 史宝 王滨 李斌 (81)
- 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)黑色素聚集素受体(MCHR)表达特性及其与无眼侧黑化的关系..... 史学营 柳学周 石莹 徐永江 史宝 王滨 李斌 (91)
- 池塘养殖牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)无眼侧体色黑化消退机理..... 朱学武 徐永江 柳学周 史宝 王滨 (103)
- 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)仔稚幼鱼肠道菌群结构比较分析..... 刘增新 柳学周 史宝 徐永江 刘权 (111)
- 两株有益菌的分离、培养、鉴定及其水质调控效果评价..... 李存玉 柳学周 徐永江 史宝 郑伟 史学营 (120)
- 黄条鲷(*Seriola aureovittata*)肌肉营养组成分析与评价..... 柳学周 徐永江 李荣 吕永军 史宝 宁劲松 王滨 (128)
- 黄条鲷(*Seriola aureovittata*)染色体核型分析..... 史宝 刘永山 柳学周 徐永江 李荣 宋雪松 周丽青 (136)
- 黄条鲷(*Seriola aureovittata*)形态度量与内部结构特征..... 李荣 徐永江 柳学周 史宝 (142)
- 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)消化道显微与超微结构..... 李斌 柳学周 徐永江 史宝 朱学武 (150)
- 太平洋鲱(*Gadus macrocephalus*)亲鱼驯化培育与早期发育特征..... 徐永江 柳学周 史宝 王滨 (159)
- 编码金属标签对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)苗种标记的效果..... 徐永江 柳学周 张凯 蓝功岗 史宝 (168)

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

CONTENTS

Vol.38 No.1 February 2017

Special Issue: Physiological and Ecological Mechanisms Underlying Reproduction and Growth in Several Marine Fishes

Research Progress of Reproductive Physiology of Flatfish in China	
..... LIU Xuezhou, SHI Bao, XU Yongjiang, WANG Bin, LIU Xinfu, MENG Zhen	(1)
Expression Characterization of the Novel Membrane Progesterin Receptor (mPR-Like) Gene During the Oocyte Maturation of Half-Smooth Tongue Sole (<i>Cynoglossus semilaevis</i>)	
..... SHI Bao, LIU Xuezhou, XU Tao, LI Xiaoni, XU Yongjiang, ZHANG Jinyong	(10)
Expression Characterization of the Novel Membrane Progesterin Receptor (mPR-Like) in Sexual Maturation of Female Japanese Flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	
..... SHI Bao, LIU Xuezhou, XU Tao, LI Xiaoni, XU Yongjiang, ZHANG Jinyong	(18)
The Expression Patterns of Membrane Progesterin Receptor α (mPR α) During Oocytes Maturation in <i>Cynoglossus semilaevis</i>	
..... LI Xiaoni, LIU Xuezhou, SHI Bao, XU Yongjiang, ZHANG Jinyong	(25)
The Expression Patterns of Membrane Progesterin Receptor α (mPR α) During Sexual Maturation in Female Japanese Flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	
..... LI Xiaoni, LIU Xuezhou, SHI Bao, XU Yongjiang, LI Xiaoxiao, ZHANG Jinyong	(34)
HCG Regulation of PGRMC1 Expression in the Oocyte of Half-Smooth Tongue Sole (<i>Cynoglossus semilaevis</i>)	
..... ZHANG Jinyong, LIU Xuezhou, SHI Bao, XU Yongjiang	(42)
Quantitative and Qualitative Expression Analysis of the Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1) in the Tissues of Female Half-Smooth Tongue Sole (<i>Cynoglossus semilaevis</i>)	
..... ZHANG Jinyong, SHI Bao, LIU Xuezhou, XU Yongjiang	(48)
Effects of Gonadotropin-Inhibitory Hormone Peptides on the Reproduction-Related Gene Expression in the Hypothalamus of Half-Smooth Tongue Sole (<i>Cynoglossus semilaevis</i>)	
..... LIU Quan, WANG Bin, LIU Xuezhou, XU Yongjiang, SHI Bao, LIU Zengxin	(56)
Molecular Cloning, Localization, and Expression Analysis of <i>gnrh2</i> in Different Tissues of Half-Smooth Tongue Sole (<i>Cynoglossus semilaevis</i>) During Ovarian Maturation	
..... WANG Bin, LIU Xuezhou, LIU Quan, ZHAO Ming, XU Yongjiang, SHI Bao	(63)
Physiological Role of GH/IGF- Axis in Ovarian Development of <i>Cynoglossus semilaevis</i>	
..... XU Yongjiang, LIU Xuezhou, SHI Ying, WANG Bin, SHI Bao, ZHANG Kai, LAN Gonggang	(73)
Cloning and Expression of Melanin-Concentrating Hormone in Half-Smooth Tongue Sole (<i>Cynoglossus semilaevis</i>)	
..... XU Yongjiang, ZHU Xuewu, LIU Xuezhou, SHI Xueying, SHI Bao, WANG Bin, LI Bin	(81)
Molecular Characterization of <i>MCHR</i> and Its Corelation with Blind-Side Hypermelanosis in <i>Cynoglossus semilaevis</i>	
..... SHI Xueying, LIU Xuezhou, SHI Ying, XU Yongjiang, SHI Bao, WANG Bin, LI Bin	(91)
Physiological Mechanisms for Degeneration of Blind-Side Hypermelanosis in Pond-Cultured Japanese Flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	
..... ZHU Xuewu, XU Yongjiang, LIU Xuezhou, SHI Bao, WANG Bin	(103)
Composition of Intestinal Bacterial Community of Japanese Flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) During Early Life Stages	
..... LIU Zengxin, LIU Xuezhou, SHI Bao, XU Yongjiang, LIU Quan	(111)
Isolation, Culture, and Identification of Two Strains of Probiotics and Their Effects on Water Quality Control	
..... LI Cunyu, LIU Xuezhou, XU Yongjiang, SHI Bao, ZHENG Wei, SHI Xueying	(120)
Analysis and Evaluation of Nutritional Composition of the Muscle of Yellowtail Kingfish (<i>Seriola aureovittata</i>)	
..... LIU Xuezhou, XU Yongjiang, LI Rong, LÜ Yongjun, SHI Bao, NING Jinsong, WANG Bin	(128)
Study on the Karyotype of Yellowtail Kingfish (<i>Seriola aureovittata</i>)	
..... SHI Bao, LIU Yongshan, LIU Xuezhou, XU Yongjiang, LI Rong, SONG Xuesong, ZHOU Liqing	(136)
Morphometric Analysis and Internal Anatomy of Yellowtail Kingfish (<i>Seriola aureovittata</i>)	
..... LI Rong, XU Yongjiang, LIU Xuezhou, SHI Bao	(142)
Structure and Ultrastructure of Alimentary Canal of <i>Cynoglossus semilaevis</i>	
..... LI Bin, LIU Xuezhou, XU Yongjiang, SHI Bao, ZHU Xuewu	(150)
Domestication of Wild Broodstock and Early Development of Pacific Cod (<i>Gadus macrocephalus</i>)	
..... XU Yongjiang, LIU Xuezhou, SHI Bao, WANG Bin	(159)
Tagging Juvenile Japanese Flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) with Coded Wire Tags	
..... XU Yongjiang, LIU Xuezhou, ZHANG Kai, LAN Gonggang, SHI Bao	(168)

我国鲆鲽类生殖内分泌研究进展*



柳学周^{1,2①} 史宝^{1,2} 徐永江^{1,2} 王滨^{1,2} 刘新富^{1,2} 孟振^{1,2}

- (1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 鱼类的生殖和苗种繁育是鱼类养殖业持续健康发展的必要前提和关键技术基础之一,是海洋生物技术的重要研究领域。近年来,我国北方沿海鱼类繁殖生理主要围绕鲆鲽类“下丘脑-垂体-性腺轴”的组织结构特征、性腺发育规律、性类固醇激素、生殖相关功能基因内分泌调控机制等方面开展了较系统的研究。本文重点介绍主要养殖鲆鲽类“下丘脑-垂体-性腺轴”中表达的重要功能基因的研究进展,并综述了鲆鲽类生殖相关组织的结构及其内分泌系统特征、性腺发育的生理特性及其与环境因子和激素诱导的关系、性类固醇激素的表达变化规律及其与水温及光周期调控关系等。旨在为鲆鲽类生殖活动的精准调控和建立苗种繁育新技术提供参考。

关键词 鲆鲽类; 生殖内分泌; 功能基因; 性类固醇激素; 生殖调控

中图分类号 S967 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0001-09

1 我国鱼类生殖生理学研究概况

我国鱼类繁殖生理研究始于 20 世纪 50 年代,在淡水鱼类“四大家鱼”人工繁育技术研究中取得进展,20 世纪 60 年代以后,相继开展了“四大家鱼”性腺发育规律、生殖系统的结构、生理机制及内分泌控制等方面的研究,取得了人工繁殖生物学原理及应用技术的突破和发展(施琰芳, 1992)。海水鱼类繁殖生理学研究起步相对较晚,20 世纪 80 年代起,海水鱼类繁殖生物学及繁育技术快速发展,20 世纪 90 年代以后,相继开展了斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)、鳗鲡(*Anguilla japonicus*)等生殖内分泌研究,克隆了一批调控繁殖相关激素及其受体的功能基因,阐明了其结构、表达特征和调控繁殖的作用等(张勇等, 2010)。对于鲆鲽类生殖内分泌研究主要集中在近 10 年,针对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)等鲆鲽类,围绕“下丘脑-垂体-性腺轴”(Hypothalamus-pituitary-

gonad axis, HPG 轴)展开了较系统的研究,包括性腺发育规律、生殖内分泌系统结构、功能基因及其作用机制和调控原理等,相关研究取得一些进展(柳学周等, 2014a、b, 2015; 史宝等, 2013; Shi *et al*, 2016)。本文侧重对鲆鲽类生殖内分泌学研究热点现有资料进行总结分析,为进一步深入开展鲆鲽类生殖内分泌调控机制研究、完善生殖精准调控技术提供基础信息。

2 鲆鲽类生殖相关功能基因及其研究进展

鱼类的生殖活动主要受“脑/下丘脑-脑垂体-性腺”HPG 轴调控,脑/下丘脑分泌产生促性腺激素释放激素(Gonadotropin releasing hormone, GnRH)刺激脑垂体促性腺激素(Gonadotropin, GtH)的合成与释放,促性腺激素作用于性腺,刺激性腺类固醇激素的生成与分泌,促进性腺发育成熟、配子生成排放。脑

*国家自然科学基金项目(31201982、31502145、3160213)、国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50)和山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2013SW042)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31201982, 31502145 and 3160213), China Agriculture Research System (CARS-50), and Shandong Youth Scientist Awards Foundation (BS2013SW042)]

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-12-14, 收修改稿日期: 2016-03-25

下丘脑分泌产生许多神经内分泌因子可以直接或间接参与生殖轴的调控,例如刺激性因子神经肽Y(Neuropeptide Y, NPY),抑制性因子多巴胺(Dopamine, DA)等调控 GnRH 和 GtH 的合成与分泌(林浩然, 2011)。目前,国内学者对多种鲆鲽类生殖相关功能基因进行了克隆表达和功能研究,主要研究了下丘脑的 *GnRH* 基因、垂体的 *GtH* 基因、性腺的芳香化酶基因(Aromatase, *CYP19/CYP17*)、雌激素受体基因(Estrogen

receptor, *ER*)、雄激素受体基因(Androgen receptor, *AR*)、促滤泡激素受体基因(Follicle-stimulating hormone receptor, *FSHR*)、促黄体激素受体基因(Luteinizing hormone receptor, *LHR*)、膜孕激素受体基因(Membrane progesterin receptor, *mPR*)、新型膜孕激素受体基因(Membrane progesterin receptor-like, *mPRL*)、类胰岛素生长因子(Insulin-like growth factor, *IGF*)等重要功能基因(表 1)。

表 1 鲆鲽类 HPG 轴相关功能基因
Tab.1 The functional genes in HPG axis of flatfish

基因名称 Gene	实验鱼 Fish species	基因序列号 GenBank No.	文献 References
<i>GnRH</i> (<i>cGnRH-II</i> , <i>sGnRH</i> , <i>sbGnRH</i>)	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	<i>cGnRH-II</i> : DO008580 <i>sbGnRH</i> : DO074693	房保海等(2006);
	半滑舌鲷 <i>C. semilaevis</i>	<i>cGnRH-II</i> : KX090947 <i>sGnRH</i> : JQ028869	赵明(2011); Zhou 等(2012)
	圆斑星鲽 <i>Verasper variegatus</i>	<i>cGnRH-II</i> : HM131601 <i>sGnRH</i> : HM131602 <i>sbGnRH</i> : HM131603	柳学周等(2013)
<i>GtH</i> (<i>FSH</i> , <i>LH</i> , <i>CGα</i>)	半滑舌鲷 <i>C. semilaevis</i>	<i>FSHβ</i> : JQ277933 <i>LHβ</i> : JQ277934 <i>CGα</i> : JQ364953	李晓晓等(2013); 王珊珊等(2013); 柳学周等(2014a);
	漠斑牙鲆 <i>Paralichthys lethostigma</i>	<i>LHβ</i> : JX002656	柳学周等(2014b);
<i>mPRs</i> (<i>mPRα</i> / <i>mPRL</i>)	半滑舌鲷 <i>C. semilaevis</i>	<i>mPRα</i> : ACW83621 <i>mPRL</i> : KF277065	史宝等(2013); 柳学周等(2015);
	牙鲆 <i>P. olivaceus</i>	<i>mPRα</i> : JX050155 <i>mPRL</i> : KM507040	
<i>ER/AR</i>	牙鲆 <i>P. olivaceus</i>	<i>ERβ</i> : AB070630	Shi 等(2009);
	半滑舌鲷 <i>C. semilaevis</i>	<i>ARα</i> : --	温海深等(2009)
<i>FSHR/LHR</i>	半滑舌鲷 <i>C. semilaevis</i>	<i>FSHR</i> : Eu661784	陈晓燕等(2010);
	大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	<i>LHR</i> : KJ561230	贾玉东等(2014);
<i>CYP19/CYP17</i>	半滑舌鲷 <i>C. semilaevis</i>	<i>P450c17-I</i> : GU338001 <i>P450c17-II</i> : EU732518	Chen 等(2010);
	牙鲆 <i>P. olivaceus</i>	<i>P450c17-I</i> : FJ815204 <i>P450c17-II</i> : FJ613529	Chen 等(2013);
	条斑星鲽 <i>Verasper moseri</i>	<i>CYP19a</i> : FJ169904	金国雄等(2010)
	星突江鲽 <i>Platichthys stellatus</i>	<i>IGF-I</i> : KC709503 <i>IGF-II</i> : KM821276	臧坤(2014) ¹⁾

2.1 下丘脑组织功能基因

2.1.1 促性腺激素释放激素(GnRH)

GnRH 是 HPG 轴的关键内分泌调控激素,在鱼类性腺发育成熟中具有重要的调控作用, GnRH 由下丘脑分泌产生,作用于垂体,刺激促性腺激素的产生释放,从而调控鱼类卵巢发育成熟。GnRH 有 4 种存在方式,包括

mGnRH (Mammalian GnRH)、*sbGnRH* (Seabream GnRH)、*cGnRH II* (Chicken GnRH-II)、*sGnRH* (Salmon GnRH)。其中, *mGnRH* 和 *sbGnRH* 具有物种特异性, *sbGnRH* 分布于中脑,在长期进化中非常保守, *sGnRH* 是鱼类特有的,主要存在于端神经节(Kavanaugh *et al*, 2008)。

目前,在鲆鲽类中最多克隆获得 3 种 *GnRH* 亚型

1) Zang K. Study on physiological function and *in vitro* recombinant expression of growth hormone and insulin-like growth factors from *Platichthys stellatus*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2014 [臧坤. 星突江鲽生长激素和胰岛素样生长因子的生理功能及体外重组研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]

基因。在圆斑星鲽(*Verasper variegatus*)中发现了 *cGnRH-II*、*sGnRH* 和 *sbGnRH* 3 个亚型基因, *cGnRH-II* 仅在脑中表达, *sbGnRH* 在各个组织都有表达, *sGnRH* 在脑、垂体和性腺中表达。脑中 *sbGnRH* 基因的表达水平随卵巢成熟过程逐渐升高, 产卵前达到峰值, 而其他 2 种 *GnRH* 基因在繁殖周期表达水平变化不显著, 表明 *sbGnRH* 基因在调控圆斑星鲽性腺发育过程中起主要作用(柳学周等, 2013)。在半滑舌鲷中目前发现 2 种 *GnRH* 亚型, *cGnRH-II* 主要在脑中表达, 雌性中的表达高于雄性, 而 *sGnRH* 只在脑和性腺中表达, 并发现在卵母细胞中存在, 受精后表达逐渐升高, 分析其具有母体遗传特性(赵明, 2011¹⁾; Zhou *et al*, 2012)。牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的 *cGnRH-II* 和 *sbGnRH* 基因在脑、垂体、卵巢、鳃、头肾和脾脏中有较丰富的表达, 而在精巢中表达微量(房宝海等, 2006)。

2.1.2 亲吻素及其受体(Kisspeptin/GPR54)和促性腺激素抑制激素及受体(GnIH/GnIH-R) *Kisspeptin/GPR54* 和 *GnIH/GnIH-R* 均是 *GnRH* 的上游调控基因, 由下丘脑分泌; *Kisspeptin/GPR54* 调控 *GnRH* 启动表达, 调节青春期启动、参与 *GtH* 分泌释放(Ogawa *et al*, 2012), 在鱼类中 *Kisspeptin/GPR54* 基因包括 2 种亚型(*Kiss-1*、*Kiss-2*)和 2 种受体基因(*KissR1* 和 *KissR2*) (Felip *et al*, 2009)。*GnIH/GnIH-R* 基因在鹌鹑(*Coturnix coturnix*)中的作用与 *Kisspeptin* 对生殖轴的调控起着相反的作用, 可抑制 *GnRH* 和 *GtH* 的合成与释放(Ogawa *et al*, 2014)。目前, 仅在金鱼(*Carassius auratus*)等几种鱼类中克隆得到 *GnIH* 的同源基因, 但是对其确切的生理功能尚不清楚(王滨等, 2016)。这两类基因在鲆鲽类的生理功能的研究正在进行中。

2.2 垂体组织功能基因

促性腺激素(*GtHs*)由垂体分泌, 包含卵泡刺激素(*FSH*)和促黄体素(*LH*)。它们由相同的 α 亚基和不同的 β 亚基以非共价键相连组成异源二聚体, 单独的每个亚基只能保留 *GtH* 激素生物活性很小一部分, α 亚基含抗原决定因素, β 亚基具有特异的生物学作用; 2 个亚基结合在一起, 行使生理功能。*GtH* 与促性腺激素受体结合, 诱导雌激素和孕激素合成, 调控配子发生, 其中, *FSH* 基因在鱼类卵巢发育早期起主导作用, *LH*

基因在调控卵巢成熟过程起主导作用(林浩然, 2011)。

在半滑舌鲷 *GtHs* 的研究中, 已克隆获得 *FSH β* 、*LH β* 、*CG α* 3 种基因, *GtHs* 在垂体中大量表达, 脑和性腺中表达也相对较高, 表明其生理功能主要作用于垂体、脑和性腺。从其繁殖周期的表达分析来看, *FSH β* 、*LH β* 和 *CG α* 基因在垂体中的表达随性腺发育持续升高, *FSH β* 基因在性腺发育至 IV 期时的垂体中表达量最高, 而 *LH β* 和 *CG α* 基因至 V 期时的垂体中表达量最高; 表明 *FSH* 调控卵巢早期发育; *LH* 的生理功能主要对卵母细胞最终成熟及卵子排出起作用(李晓晓等, 2013; 王珊珊等, 2013; 柳学周等, 2014a)。对漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*) *LH β* 基因表达特性分析表明, 卵巢中 *LH β* 基因表达水平也是在 V 期达到峰值, 证实 *LH β* 基因在调控卵巢成熟过程中起主导作用(柳学周等, 2014b)。

2.3 性腺组织功能基因

2.3.1 芳香化酶(Aromatase)基因 芳香化酶是类固醇激素代谢中的重要酶类, 是鱼体性腺和脑中雌激素合成的关键酶, 参与繁殖周期调控。已有研究表明, *Aromatase* 调节神经内分泌和繁殖功能, 并参与鱼类早期性别分化(Uno *et al*, 2012; Xiong *et al*, 2015)。它的基因包括 *CYP19/CYP17* 二类基因, 各包含 2 种亚型, *CYP19a/CYP19b* 和 *P450c17- I/P450c17- II*。

对条斑星鲽 *CYP19a* 基因的研究发现, 其主要在脑、卵巢和精巢中表达, 表明其参与繁殖调控; *CYP19a* 基因在 II 期、III 期精巢中表达较高, 在 V 期精巢中表达最低, 是因为精巢发育早期的鱼正处在性腺发育期, 此时, 需要 *CYP19a* 基因刺激雌二醇大量生成, 从而促进精巢中精子发生和发育(金国雄等, 2010)。对牙鲆的研究中发现, *P450c17- I* mRNA 在心脏、精巢和卵巢表达丰富, *P450c17- II* mRNA 在脑、头肾、肾、精巢和卵巢表达丰富, 表明其在繁殖相关组织中参与性类固醇激素生物合成; 在精巢不同发育阶段均检测到 *P450c17- I* 和 *P450c17- II* mRNA 表达, 并且这 2 种基因的表达水平变化与血浆中 T 水平和性腺指数变化相关, 认为这 2 种基因通过参与调控性类固醇激素生成, 进而参与调节精子发生和成熟(史宝, 2010)²⁾; 雌性牙鲆 *CYP19a* 基因调控区甲基化, 可能导致芳香化酶的表达量降低, 从而影响牙鲆繁殖内分

1) Zhao M. Studies on reproductive physiological characteristics and molecular cloning of *cGnRH-II* in tongue sole, *Gynoglossus semilaevis* Günther. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2001 [赵明. 半滑舌鲷生殖生理特性及 *GnRH* 克隆初步研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2011]

2) Shi B. Study on the molecular mechanisms of reproductive endocrinology in *Paralichthys olivaceus* and *Paralichthys lethostigma*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China. 2010, 1-181 [史宝. 牙鲆繁殖内分泌分子机理研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010, 1-181]

泌过程(何峰等, 2011)。在半滑舌鲷研究中发现, *P450c17-I* 主要在性腺内表达, *P450c17-II* 主要在性腺、头肾、脑中表达; 而在半滑舌鲷卵巢不同发育阶段, 卵巢及脑中 *P450c17-I* 和 *P450c17-II* 基因表达变化趋势与卵巢发育正相关(Chen *et al*, 2009、2013)。

2.3.2 雌激素受体(ER)和雄激素受体(AR) 各包含 2 种亚型基因。雌激素受体包括 *ER α* 和 *ER β* 2 种亚型(Coumaillau *et al*, 2015), 雄激素受体有 *AR α* 和 *AR β* 2 种存在亚型(Schulz *et al*, 2010)。雌、雄激素受体必须结合雌、雄激素, 从而实现对 HPG 轴的调控和反馈调节功能(Melo *et al*, 2015)。

在牙鲆雌激素受体 β 基因(*ER β*)中发现 2 个单核苷酸多态性位点(SNP), 研究表明, SNP1 与雌性牙鲆性腺指数相关, SNP2 与雌性牙鲆的雌二醇水平和性腺指数相关。在 SNP2 位点, *AB* 基因型个体比 *AA* 基因型个体具有较高的雌激素水平和性腺指数(Shi *et al*, 2009a)。*FOXL2* 基因具有参与卵巢发育、滤泡细胞分化和维持卵巢生理功能的作用。对牙鲆 *FOXL2* 基因突变位点 SNP1 对牙鲆性腺指数效应均达到显著水平(Shi *et al*, 2009b)。牙鲆卵巢和精巢转录组数据注释结果表明, 雌激素通过雌激素受体 *ER* 基因信号通路参与牙鲆性别决定和性腺发育(Fan *et al*, 2014)。半滑舌鲷雄激素受体 *AR* 基因组织表达分析表明, *AR* 基因在半滑舌鲷的性腺、肝和脑等 11 种组织中均有表达, 表明其广泛参与调控雄激素生理功能(温海深等, 2009)。

2.3.3 促滤泡激素受体(FSHR)和促黄体激素受体(LHR) *FSHR* 和 *LHR* 介导相应促滤泡激素和促黄体激素, 通过激活 cAMP 等信号通路, 参与生殖调控。*FSHR* 主要在卵巢的颗粒细胞层和精巢的谢尔托里氏细胞中表达, 参与配子发育(Themmen *et al*, 2000; Cahoreau *et al*, 2015)。*LHR* 主要定位在成熟的卵母细胞中的滤泡细胞和颗粒细胞内, 调控孕激素介导的生殖细胞成熟(Andersson *et al*, 2013)。

半滑舌鲷促滤泡激素受体 *FSHR* 基因组织表达广泛, 并在卵巢和精巢中大量表达; 从繁殖周期来看, 卵巢各发育期中 *FSHR* mRNA 逐渐升高, 在产卵成熟期时表达最高, 表明其与卵母细胞的成熟能力和排卵

有关(陈晓燕等, 2010)。大菱鲆促黄体激素受体 *LHR* 基因组织表达也较广泛, 以卵巢中的表达最高, 表明 *LHR* 基因促进了大菱鲆卵巢的发育和排卵行为(贾玉东等, 2014)。

2.3.4 膜孕激素受体家族(mPRs)基因 *mPRs* 主要作用是介导孕激素在繁殖周期中调控配子发育, 膜孕激素受体结合孕激素进而激活成熟促进因子(MPF)促使卵母细胞成熟。膜孕激素受体在脑中还可介导 GnRH 生殖信号的产生, 参与生殖轴的调控。另外, 可诱导精子顶体反应, 促进精子活力(Nagahama *et al*, 2008)。近年来研究发现, 膜孕激素受体存在 *mPR α* 、*mPR β* 、*mPR γ* 3 种亚型, 在已研究的近 10 种鱼类中, *mPR α* 基因在多种鱼类中获得, 而获得 *mPR β* 、*mPR γ* 基因的鱼种较少(Kazeto *et al*, 2005; Uno *et al*, 2012; 柳学周等, 2015; 史宝, 2010¹⁾)。

对鲆鲽类膜孕激素受体研究中, 获得了牙鲆和半滑舌鲷 *mPR α* 基因, 未发现 *mPR β* 、*mPR γ* 基因。牙鲆和半滑舌鲷 *mPR α* 基因在脑和卵巢中大量表达, 垂体组织表达也较高; 表明其通过中枢神经作用于性腺, 促进卵巢发育。在不同性腺发育期, *mPR α* 基因在脑、性腺、垂体组织中的表达随着性腺发育而增高, 在成熟期的 V 期时达到高值, 证实其通过 HPG 轴的协同作用介导孕激素推动卵巢发育进程(史宝等, 2013; 李晓晓, 2013²⁾)。

最近, 在牙鲆和半滑舌鲷中发现了一种新型膜孕激素受体基因(*mPRL*), 该基因结构与 *mPR α* 、*mPR β* 、*mPR γ* 3 种亚型不同, 跨膜区域和蛋白结合位点均有差异, 与其他膜孕激素受体家族基因相似度也存在较大区别, 并且不在一个进化分支。研究发现, *mPRL* 基因与 *mPR α* 基因不同, 其在卵巢的表达远远高于在脑、垂体、肝脏等组织中的表达, 预示其主要围绕性腺发挥其生理功能。在不同发育阶段的卵母细胞中, *mPRL* 基因表达水平从 II 时相卵母细胞到 V 时相卵母细胞逐渐升高; 在繁殖周期的卵巢组织中, *mPRL* 基因的表达水平从性腺发育 II 期到 V 期也是逐渐升高, 与不同发育阶段血清中孕激素和促黄体激素变化趋势相吻合, 由此可见, *mPRL* 基因在半滑舌鲷卵母细胞成熟过程中具有重要的生理功能, 与 *LH β* 基因协同作

1) Shi B. Study on the molecular mechanisms of reproductive endocrinology in *Paralichthys olivaceus* and *Paralichthys lethostigma*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China. 2010, 1-181 [史宝. 牙鲆繁殖内分泌分子机理研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010, 1-181]

2) Li XX. Study on the physiological function of membrane progesterin receptor in the reproductive cycle of flatfish. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013 [李晓晓. 膜孕激素受体在鲆鲽类繁殖周期中的生理功能研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013]

用促进卵母细胞成熟(柳学周等, 2015; Shi *et al.*, 2016)。

2.3.5 类胰岛素生长因子(IGFs) IGFs 是鱼类生长发育的重要功能基因, 最近, 已有研究证实了 IGFs 在鱼类生殖调控中也发挥重要作用。IGFs mRNA 和蛋白在硬骨鱼类的精原细胞、精母细胞、支持细胞及间质细胞中均有发现, 表明 IGFs 参与了性腺的发育调节(Caruso *et al.*, 2011)。

在星突江鲟(*Platichthys stellatus*)克隆了生长相关的 IGF-I 和 IGF-II 基因, 发现这 2 个基因在不同发育期的卵巢中表达水平随卵巢发育过程而逐渐升高, 在 V 期和 VI 期时显著表达, 与血浆中睾酮(T)、雌二醇(E₂)水平随卵巢发育逐渐升高的现象相一致, 认为 IGF-I 和 IGF-II 可能通过自分泌和旁分泌等途径参与到卵巢发育调控过程(臧坤, 2014)¹⁾。

3 鲟鳇类生殖生理学研究进展

采用 HE、Jaffri、HA、Mallory 和 PAS 染色法, 结合免疫组织化学方法研究了石鲟(*Platichthys bicoloratus*)和条斑星鲟(*Verasper moseri*)垂体组织结构, 其脑垂体由神经垂体和腺垂体两部分组成, 鉴别和定位神经垂体为一束神经纤维, 中间夹杂 1 种垂体细胞和 1 种胶质; 前腺垂体内含有催乳激素分泌细胞、促肾上腺皮质激素分泌细胞和促甲状腺激素分泌细胞; 中腺垂体存有生长激素分泌细胞、促甲状腺激素分泌细胞和促性腺激素分泌细胞; 后腺垂体内含有 1 种促黑色素激素分泌细胞(温海深等, 2007; 倪娜等, 2012)。

半滑舌鲟和圆斑星鲟性腺发育规律和特征研究表明, 卵巢发育经历 6 个时期, 相应的卵母细胞也分为 6 个时相; III 期、IV 期为性腺快速发育期, V 期为产卵期, 产卵后进入 VI 期并恢复到 II 期; 性腺指数(GSI)、肝脏指数(HSI)和肥满度(CF)在亲鱼的年周期发育中呈现规律性的变化, 与卵巢发育密切关联; 在 V 期时, GSI 达到最高峰, 产卵后, GSI 显著下降, 此时, HSI 显著升高至峰值, 为下次性腺发育储备能量(柳学周等, 2009; 陈彩芳等, 2010)。

半滑舌鲟、圆斑星鲟、条斑星鲟和石鲟精巢属于小叶型, 生殖细胞经历了精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞和精子 5 个发育阶段。其中, 半滑舌鲟精巢前端有贮精囊; 半滑舌鲟、条斑星鲟、星突江鲟精子主要包括头部、中段和尾部 3 部分, 属

于简单的原始类型, 其中, 半滑舌鲟精子头部为杯状, U 型细胞核, 条斑星鲟、星突江鲟精子头部为圆形(吴莹莹等, 2007; 温海深等, 2010; 徐永江等, 2010、2012; 李春广等, 2012)。

在人工养殖条件下, 半滑舌鲟和圆斑星鲟雌性亲鱼血浆性类固醇激素年周期变化及其与卵巢发育成熟及温光调控的关系表明, 亲鱼血浆中 E₂ 在产卵期达峰值; 排卵结束后, E₂ 表达水平降低。血浆中 T 含量在产卵期间保持高表达水平。血浆 E₂ 水平与 GSI 和 HSI 值的变化都呈现显著的正相关关系。水温 and 光周期对卵巢发育具有明显的影响, 并显著影响 E₂ 的表达, GSI 与水温存在显著的负相关关系, HSI 与水温呈显著负相关, 而 CF 与光周期呈现显著的负相关(徐永江等, 2011a、b)。而在人工养殖条件下, 条斑星鲟雄性亲鱼血浆中 T 水平在繁殖季节达到峰值, 其后显著下降并在其后的月份保持较低水平(李春广等, 2012)。

注射外源激素鲑鱼(*Oncorhynchus sp.*)促性腺激素释放激素类似物和人绒毛膜促性腺激素, 可有效提高条斑星鲟雄鱼精子质量(Melo *et al.*, 2015)。外源激素诱导后, 条斑星鲟精子质量明显提升, 精液黏稠度大为降低, 精液流动性和液化能力增强, 精子激活率和快速激活率显著提高, 快速活动时间和精子寿命延长。同时, 血浆中 T 和 E₂ 表达水平明显升高, 在 96 h 时达到峰值。注射外源激素鲑鱼促性腺激素释放激素(GnRH)对 2 龄圆斑星鲟雌鱼卵巢发育具有一定的诱导效果。注射 GnRH 后, 有约 30% 实验鱼的卵巢部位可见相对明显的隆起, 其卵母细胞可达到 V 时相早期, 表明 GnRH 诱导了卵母细胞发育成熟过程(徐永江等, 2012、2013)。

野生褐牙鲟(*Paralichthys olivaceus*)亲鱼在性腺发育不同阶段卵巢的脂肪和脂肪酸组成的分析结果表明, 多不饱和脂肪酸 PUFA 与牙鲟亲鱼的性腺发育关系较为密切, 多不饱和脂肪酸为牙鲟亲鱼正常的繁殖所必需, 在亲鱼培育过程中, 需要补充含有适量高不饱和脂肪酸(王际英等, 2011)。

4 讨论与展望

4.1 新型生殖功能基因挖掘

鱼类生殖是多个基因综合调控的过程, 目前, 已

1) Zang K. Study on physiological function and *in vitro* recombinant expression of growth hormone and insulin-like growth factors from *Platichthys stellatus*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2014 [臧坤. 星突江鲟生长激素和胰岛素样生长因子的生理功能及体外重组研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]

研究有限的生殖相关功能基因尚不能全面、精准地揭示生殖过程的调控机制。因此,新的生殖功能基因的发掘逐步受到关注。在高等脊椎动物中,报道的大量生殖调控基因,有许多仍没有在鱼类中鉴别到。近年来,半滑舌鳎、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)等全基因组相继公布,为功能基因的挖掘提供了便利条件。伴随着研究手段和方法的更新,为筛选新的鱼类生殖过程关键作用基因、解析其调控通路带来了新的突破口。

4.2 生殖功能基因与环境的互作关系

鱼类生殖是由外界温光等环境因子和内源因子共同调控下完成的。目前,对于鲟鳇类生殖内分泌研究已获得了一批相关功能基因,了解了其作用机制,但是这些功能基因与光照、水温、营养等环境之间是何种相互作用关系尚不明了。因此,探明各生殖相关功能基因在不同环境条件下的作用原理,阐明环境因子对功能基因的调控途径,摸清环境调控生殖过程中各种繁殖基因的表达变化,构建不同环境条件调控功能基因表达和性腺发育互作关系,是今后建立生殖精准调控技术的重要研究内容。

4.3 基因调控网络

国际上,基于生物信息学、高通量测序技术、功能基因组学、蛋白质组学等现代生物技术的生物性状的基因网络调控或组学调控机制研究成为当前的研究热点,并不断改变着人们对鱼类 HPG 轴的认识。已有研究证明,鱼类生殖过程受到众多基因的作用(Ma *et al.*, 2015),同时,某些基因对多个不同性状都具有调控作用,说明鱼类的生殖涉及到多基因、多通路的分子功能网络的相互作用,如生长、体色关键基因 *GH*、*IGFs*、*POMC* 等都参与了鱼类生殖细胞发育和成熟的调控过程,并通过自分泌或旁分泌等多层次通路起作用,想通过单一基因的研究而形成对生殖过程全局调控机制的认识是非常困难的(Xu *et al.*, 2016; 刘芝亮, 2013¹⁾; 顾源, 2011²⁾)。因此,针对多基因生殖性状相关的“分子群”探索生殖过程的组合式网络调控通路,通过生物信息学和大数据分析,进一步揭示众多功能基因在生殖调控中的互作机制以及基因间的互作网

络关系或网络系统应成为今后重要研究方向。

4.4 功能基因产品的开发

目前,有关鱼类功能基因作用机制和调控技术研究不断深入,对于生殖相关重要功能基因进行体外重组技术研究已逐渐开展,采用原核、真核表达系统获得基因重组蛋白产物,通过规模化发酵技术,进行重组蛋白产物的大规模制备,并采用在体和离体实验进行功能基因产品的生物学活性分析及功能验证;同时,分析不同基因产物组合配伍效果及其在 HPG 轴不同层次上的促熟催产效果,从而探索出高效鱼类催产剂的制备方法,并加以推广应用,保障鱼类的健康繁殖,建立精准的繁育体系,这也是下一步研究的重要课题。

参 考 文 献

- Andersson E, Schulz RW, Male R, *et al.* Pituitary gonadotropin and ovarian gonadotropin receptor transcript levels: Seasonal and photoperiod-induced changes in the reproductive physiology of female Atlantic salmon (*Salmo salar*). *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 191(9): 247–258
- Cahoreau C, Klett D, Combarnous Y, *et al.* Structure–function relationships of glycoprotein hormones and their subunits' ancestors. *Frontiers Endocrinology* 2015, 6: 26
- Caruso MA, Sheridan MA. New insights into the signaling system and function of insulin in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 2011, 173(2): 227–247
- Chen CF, Wen HS, Chen XY, *et al.* Studies on ovarian development and spawn type of cultured half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*. *Marine Sciences*, 2010, 34(8): 29–34 [陈彩芳, 温海深, 陈晓燕, 等. 人工养殖半滑舌鳎卵巢发育及其产卵类型研究. *海洋科学*, 2010, 34(8): 29–34]
- Chen CF, Wen HS, He F, *et al.* Molecular mechanism of P450c17-II (17, 20-lyase) regulating gonad development in female *Cynoglossus semilaevis*. *Aquaculture Research*, 2013, 44(9): 1459–1469
- Chen CF, Wen HS, Wang ZP, *et al.* Cloning and expression of P450c17-I (17 α -hydroxylase/17, 20-lyase) in brain and ovary during gonad development in *Cynoglossus semilaevis*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2010, 36(4): 1001–1012
- Chen XY, Wen HS, He F, *et al.* Cloning of FSHR and expression

1) Liu ZL. Studies on key genes along grow axis from *Cynoglossus semilaevis* Günther: *in vitro* recombinant expression and role in growth and reproduction regulation. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013 [刘芝亮. 半滑舌鳎生长轴关键基因的重组表达及对生长与生殖的调控机制研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013]

2) Gu Y. Expression, antibody production of IGF-3 and its possible receptor characterization in Nile tilapia. Master's Thesis of Southwest University, 2011 [顾源. 尼罗罗非鱼 IGF-3 蛋白表达、抗体制备及其可能受体的初步研究. 西南大学硕士研究生学位论文, 2011]

- analysis during the reproductive cycle in female *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(9): 1309–1318 [陈晓燕, 温海深, 何峰, 等. 半滑舌鲷促滤泡激素受体基因克隆及其在雌鱼生殖周期中的表达. *水产学报*, 2010, 34(9): 1309–1318]
- Coumilleau P, Pellegrini E, Adrio F, *et al.* Aromatase, estrogen receptors and brain development in fish and amphibians. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, 1849(2): 152–162
- Fan Z, You F, Wang L, *et al.* Gonadal transcriptome analysis of male and female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Biomed Research International*, 2014, (2): 1153–1166
- Fang BH, Sun XQ, Qu LY, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of two types of GnRH gene in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Chinese High Technology Letters*, 2006, 16(5): 529–533 [房保海, 孙修勤, 曲凌云, 等. 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*, 2006, 16(5): 529–533]
- Felip A, Zanuy S, Pineda R, *et al.* Evidence for two distinct *Kiss* genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. *Molecular Cellular Endocrinology*, 2009, 312(1–2): 61–71
- He F, Ma RQ, Zhao X, *et al.* Polymorphisms in “CpG” island region of *CYP19A* gene promoter associated with reproductive performance in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Periodical of Ocean University of China*, 2011, 41(9): 19–24 [何峰, 马瑞芹, 赵旭, 等. 雌牙鲆 *CYP19A* 基因启动子“CpG”岛区的单核苷酸多态性及与繁殖性能的关联分析. *中国海洋大学学报*, 2011, 41(9): 19–24]
- Jia YD, Meng Z, Niu HX, *et al.* Cloning and bioinformatics analysis of *LHR* gene in *Scophthalmus maximus*. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(3): 305–315 [贾玉东, 孟振, 牛化欣, 等. 大菱鲆促黄体激素受体基因的克隆及其生物信息学分析. *水产学报*, 2014, 38(3): 305–315]
- Jin GX, Wen HS, Liu XZ, *et al.* Cloning of *CYP19a* gene and expression analysis during the reproductive cycle in males of *Verasper moser*. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(2): 194–203 [金国雄, 温海深, 柳学周, 等. 条斑星鲽 *CYP19a* 基因克隆及其在雄鱼生殖周期中的表达. *水产学报*, 2010, 34(2): 194–203]
- Kavanaugh SI, Nozaki M, Sower SA. Origins of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in vertebrates: Identification of a novel GnRH in a basal vertebrate, the sea lamprey. *Endocrinology*, 2008, 149(8): 3860–3869
- Kazeto Y, Goto-Kazeto R, Trant JM. Membrane-bound progesterin receptors in channel catfish and zebrafish ovary: Changes in gene expression associated with the reproductive cycles and hormonal reagents. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 142(1–2): 204–211
- Li CG, Liu XZ, Xu Y, *et al.* Annual maturation of testis correlated with sex steroids level in male barfin flounder broodstocks. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(3): 35–41 [李春广, 柳学周, 徐永江, 等. 条斑星鲽精巢年周期发育规律和血液性类固醇激素含量变化. *渔业科学进展*, 2012, 33(3): 35–41]
- Li XX, Liu XZ, Shi B, *et al.* Cloning and mRNA expression pattern of common glycoprotein α subunit of GTH in tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(5): 23–30 [李晓晓, 柳学周, 史宝, 等. 半滑舌鲷促性腺激素 α 亚基 cDNA 的克隆及组织表达特征. *渔业科学进展*, 2013, 34(5): 23–30]
- Lin HR. *Fish Physiology*. Guangzhou: Sun Yat-Sen University Press, 2011. [林浩然. *鱼类生理学*. 广州: 中山大学出版社, 2011]
- Liu XZ, Shi B, Li XX, *et al.* Molecular characterization of the novel membrane progesterin receptor gene and its role during ovarian development in the half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(4): 608–619 [柳学周, 史宝, 李晓晓, 等. 半滑舌鲷新型膜孕激素受体基因分子特征及其在卵巢发育过程的作用. *中国水产科学*, 2015, 22(4): 608–619]
- Liu XZ, Shi B, Wang SS, *et al.* Full length cDNA cloning and expression of luteinizing hormone (LH) and which serum concentration was measured in half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Engineering Sciences*, 2014a, 16(9): 50–60 [柳学周, 史宝, 王珊珊, 等. 半滑舌鲷促黄体激素基因克隆和表达分析及其血清浓度测定. *中国工程科学*, 2014a, 16(9): 50–60]
- Liu XZ, Xu YJ, Liao MJ, *et al.* Cloning and expression characteristics of gonadotropin releasing hormone genes in spotted halibut *Verasper variegatus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(1): 12–24 [柳学周, 徐永江, 廖梅杰, 等. 圆斑星鲽促性腺激素释放激素基因克隆及表达特性. *中国水产科学*, 2013, 20(1): 12–24]
- Liu XZ, XU YJ, Liu NZ, *et al.* Study on histological and morphometric characters of gonad development of *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(6): 25–35 [柳学周, 徐永江, 刘乃真, 等. 半滑舌鲷卵巢发育的组织学和形态数量特征研究. *渔业科学进展*, 2009, 30(6): 25–35]
- Liu XZ, Zang K, Xu YJ, *et al.* Molecular cloning and differential expression of LH β subunit during the ovarian maturation cycle of *Paralichthys lethostigma*. *Progress in Fishery Sciences*, 2014b, 35(4): 22–31 [柳学周, 臧坤, 徐永江, 等. 漠斑牙鲆 (*Paralichthys lethostigma*) LH β 基因克隆及其在卵巢不同发育期的表达特征. *渔业科学进展*, 2014b, 35(4): 22–31]
- Liu XZ, Zhuang ZM. *Reproductive biology and culture technology of tongue sole*. Beijing: China Agricultural Press, 2014 [柳学周, 庄志猛. *半滑舌鲷繁育理论与养殖技术*. 北京: 中国农业出版社, 2014]
- Ma Y, Juntti SA, Hu CK, *et al.* Electrical synapses connect a network of gonadotropin releasing hormone neurons in a cichlid fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112(12): 3805–3810
- Melo MC, Dijk P, Andersson E, *et al.* Androgens directly stimulate spermatogonial differentiation in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *General and Comparative Endocrinology*, 2015, 211: 52–61
- Nagahama Y, Yamashita M. Regulation of oocyte maturation in fish. *Development, Growth and Differentiation*, 2008, 50:

- 195–219
- Ni N, Liu XZ, Xu YJ, *et al.* Histological studies on the pituitary gland of female barfin flounder *Verasper moseri*. Journal of Tropical Oceanography, 2012, 31(6): 97–102 [倪娜, 柳学周, 徐永江, 等. 雌性条斑星鲽脑垂体组织学观察. 热带海洋学报, 2012, 31(6): 97–102]
- Ni N, Liu XZ, Xu YJ, *et al.* The study of gonadal development and steroid hormone annual change in barfin flounder *Verasper moseri*. Progress in Fishery Sciences, 2011, 32(3): 16–25 [倪娜, 柳学周, 徐永江, 等. 条斑星鲽卵巢发育规律和性类固醇激素周年变化研究. 渔业科学进展, 2011, 32(3): 16–25]
- Ogawa S, Ng KW, Ramadasan PN, *et al.* Habenular Kiss1 neurons modulate the serotonergic system in the brain of zebrafish. Endocrinology, 2012, 153(5): 2398–2407
- Ogawa S, Parhar IS. 2014. Structural and functional divergence of gonadotropin-inhibitory hormone from jawless fish to mammals. Frontiers Endocrinology, 2014, 5(5): 177
- Schulz RW, de França LR, Lareyre J, *et al.* Spermatogenesis in fish. General and Comparative Endocrinology, 2010, 165: 390–411
- Shi B, Li XX, Liu XZ, *et al.* Molecular cloning and tissue expression analysis of membrane progesterin receptor alpha gene (mPR α) from half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(3): 61–67 [史宝, 李晓晓, 柳学周, 等. 半滑舌鲷膜孕激素受体基因克隆与组织表达分析. 渔业科学进展, 2013, 34(3): 61–67]
- Shi B, Liu XZ, Thomas P, *et al.* Identification and characterization of a progesterin and adipoQ receptor (PAQR) structurally related to Paqr7 in the ovary of *Cynoglossus semilaevis* and its potential role in regulating oocyte maturation. General and Comparative Endocrinology, 2016, 237: 109–120
- Shi B, Wen HS, He F, *et al.* Single nucleotide polymorphisms within the estrogen receptor beta gene are linked with reproductive indices in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2009a, 154(1): 62–67
- Shi B, Wen HS, He F, *et al.* Association of reproductive performance with SNPs of *FOXL2* gene by SSCP in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2009b, 153(1): 1–7
- Shi QF. An outline of advances on reproductive physiology of fish in china. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 1992, 23(3): 325–333 [施琰芳. 我国鱼类生殖生理学研究概况. 海洋与湖沼, 1992, 23(3): 325–333]
- Themmen APN, Huhtaniemi IT. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: Elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. Endocrine Reviews, 2000, 21(5): 551–583
- Tokumoto T, Tokumoto M, Oshima T, *et al.* Characterization of multiple membrane progesterin receptor (mPR) subtypes from the goldfish ovary and their roles in the induction of oocyte maturation. General and Comparative Endocrinology, 2012, 177(1): 168–176
- Uno T, Ishizuka M, Itakura T. Cytochrome P450 (*CYP*) in fish. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2012, 34(1): 1–13
- Wang B, Liu XZ, Xu YJ, *et al.* Progress of research on gonadotropin-inhibitory hormone and its receptors in fish. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(2): 278–287 [王滨, 柳学周, 徐永江, 等. 鱼类促性腺激素抑制激素及其受体的研究进展. 水产学报, 2016, 40(2): 278–287]
- Wang JY, Miao SY, Li BS, *et al.* A comparative study on lipid and fatty acid compositions of wild *Paralichthys olivaceus* broodstocks during different ovary development stages. Journal of Shanghai Ocean University, 2011, 20(2): 238–243 [王际英, 苗淑彦, 李宝山, 等. 野生褐牙鲆亲鱼不同卵巢发育期脂肪和脂肪酸组成的分析与比较. 上海海洋大学学报, 2011, 20(2): 238–243]
- Wang SS, Liu XZ, Shi B, *et al.* Full length cDNA cloning and tissue expression analysis of follicle-stimulating hormone (FSH) from half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(6): 15–23 [王珊珊, 柳学周, 史宝, 等. 半滑舌鲷滤泡激素基因全长 cDNA 的克隆与组织表达分析. 渔业科学进展, 2013, 34(6): 15–23]
- Wen HS, Gao L. Studies on histological physiology of the pituitary in stone flounder (*Kareius bicoloratus*). Marine Fisheries Research, 2007, 28(5): 1–6 [温海深, 高玲. 石鲷脑垂体组织生理学研究. 海洋水产研究, 2007, 28(5): 1–6]
- Wen HS, Mu XJ, Zhang JR, *et al.* Studies on morphology and structure as well as endocrine function of seminal vesicle in the farmed male *Cynoglossus semilaevis*. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(9): 33–38 [温海深, 牟幸江, 张葭人, 等. 雄性半滑舌鲷贮精囊形态结构与内分泌功能初步研究. 中国海洋大学学报, 2010, 40(9): 33–38]
- Wen HS, Zhang JR, Chen CF, *et al.* Cloning and expression analysis of male half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) androgen receptor gene. Periodical of Ocean University of China, 2009, 39(3): 387–391 [温海深, 张葭人, 陈彩芳, 等. 雄性半滑舌鲷雄激素受体基因的克隆与表达分析. 中国海洋大学学报, 2009, 39(3): 387–391]
- Wu YY, Liu XZ, Wang QY, *et al.* Ultrastructure of the spermatozoon of the teleost, *Cynoglossus semilaevis*. Acta Oceanologica Sinica, 2007, 29(6): 167–171 [吴莹莹, 柳学周, 王清印, 等. 半滑舌鲷精子的超微结构. 海洋学报, 2007, 29(6): 167–171]
- Xiong ST, Jing J, Wu J, *et al.* Characterization and sexual dimorphic expression of Cytochrome P450 genes in the hypothalamic-pituitary-gonad axis of yellow catfish. General and Comparative Endocrinology, 2015, 216: 90–97
- Xu YJ, Liu XZ, Liu XU, *et al.* Study on spermatozoon ultrastructure of barfin flounder *Verasper moseri*. Progress in Fishery Sciences, 2012, 31(5): 8–14 [徐永江, 柳学周, 刘新富, 等. 条斑星鲽精子超微结构研究. 渔业科学进展, 2010, 31(5): 8–14]
- Xu YJ, Liu XZ, Liu ZG, *et al.* Histological and morphometric studies on the annual gonadal maturation cycle of spotted halibut *Verasper variegatus*. Progress in Fishery Sciences, 2011a, 32(3): 7–15 [徐永江, 柳学周, 刘君刚, 等. 圆斑星鲽卵巢发育的组织学和数量形态特征研究. 渔业科学进展, 2011a, 32(3): 7–15]
- Xu YJ, Liu XZ, Wang QY, *et al.* Annual gonadal maturation cycle of captive spotted halibut, *Verasper variegatus*:

- correlation with serum sex steroids and photothermal regulation. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011b, 18(4): 836–846 [徐永江, 柳学周, 王清印, 等. 养殖圆斑星鲽血浆性类固醇激素表达与卵巢发育及温光调控的关系. *中国水产科学*, 2011b, 18(4): 836–846]
- Xu YJ, Liu XZ, Wang QY, *et al.* Relationships between serum sex steroids levels and gonadal development and photothermal regulation during the annual maturation of captive *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2011c, 42(1): 67–74 [徐永江, 柳学周, 王清印, 等. 半滑舌鲽(*Cynoglossus semilaevis*)血浆性类固醇激素表达与卵巢发育及温光调控的关系研究. *海洋与湖沼*, 2011c, 42(1): 67–74]
- Xu YJ, Liu XZ, Wang YY, *et al.* Effects of exogenous hormones induction on the sperm quality of barfin flounder *Verasper moseri*. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2012, 43(6): 1170–1176 [徐永江, 柳学周, 王妍妍, 等. 外源激素诱导对条斑星鲽(*Verasper moseri*)精子质量的影响. *海洋与湖沼*, 2012, 43(6): 1170–1176]
- Xu YJ, Liu XZ, Wang YY, *et al.* Effects of exogenous hormones on the ovarian development of sexually immature spotted halibut *Verasper variegatus*. *Advances in Marine Science*, 2013, 31(2): 247–255 [徐永江, 柳学周, 王妍妍, 等. 外源激素对二龄圆斑星鲽卵巢发育诱导效果的初步研究. *海洋科学进展*, 2013, 31(2): 247–255]
- Xu YJ, Wang B, Liu XZ, *et al.* Evidences for involvement of growth hormone and insulin-like growth factor in ovarian development of starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 2016, DOI: 10.1007/s10695-016-0307-2
- Yang H, Chen H, Zhao H, *et al.* Molecular cloning of the insulin-like growth factor 3 and difference in the expression of IGF genes in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 186: 68–75
- Zhang Y, Li SS, Liu Y, *et al.* Current research and future direction of reproductive related gene in fish farming. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 17(2): 363–368 [张勇, 李水生, 刘云, 等. 养殖鱼类生殖内分泌调控相关功能基因的研究和应用. *中国水产科学*, 2010, 17(2): 363–368]
- Zhou XS, Yi QL, Zhong QW, *et al.* Molecular cloning, tissue distribution, and ontogeny of gonadotropin-releasing hormone III gene (GnRH-III) in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 163(1): 59–64
- Zhu Y, Rice CD, Pang F, *et al.* Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2003, 100(5): 2231–2236

(编辑 陈严)

Research Progress of Reproductive Physiology of Flatfish in China

LIU Xuezhou^{1,2①}, SHI Bao^{1,2}, XU Yongjiang^{1,2}, WANG Bin^{1,2}, LIU Xinfu^{1,2}, MENG Zhen^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

Abstract The key to sustain the development of marine finfish aquaculture is to improve the understanding of reproductive physiology, which will pave the way for the successful breeding programs and larviculture. Recently, in China, northern coastal research institutes have made significant advances in the field of reproductive physiology in flatfish with focus on the hypothalamus-pituitary-gonadal axis (HPG axis), including histological characteristics, gonadal development, plasma sex steroids, and reproductive endocrine and regulatory mechanisms. This paper summarized the mechanisms of important functional genes in the HPG axis using *Cynoglossus semilaevis* and *Paralichthys olivaceus* as examples. Furthermore, we provided here a synoptic contents of some of these important advances related to the HPG axis, including the histology and endocrinology of secretory tissue cells, physiological characters of gonads, environmental factors, hormone-induced spawning, temperature, photoperiod and sex steroid levels, with emphasis on *C. semilaevis*, *Verasper moseri* and *Kareius bicoloratus*. This paper aims to provide the guidance for new breeding programs and larviculture in flatfish.

Key words Flatfish; Reproductive endocrinology; Function gene; Sex steroids; Reproductive regulation

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)新型膜孕激素受体基因(*mPRL*)在卵母细胞成熟过程中的表达特征*



史宝^{1,2} 柳学周^{1,2①} 徐涛³ 李晓妮¹ 徐永江^{1,2} 张金勇¹

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 山东省渔业技术推广站 济南 250013)

摘要 为进一步提高半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)人工育苗技术的水平,对半滑舌鳎新型膜孕激素受体(mPR-like, mPRL)基因的表达特征和作用机制进行了研究。应用实时定量 PCR 方法分析 *mPRL* mRNA 在卵子形成过程中的时序表达,发现半滑舌鳎 *mPRL* mRNA 相对表达量的最高值出现在性成熟阶段卵巢的 V 时相卵母细胞。原位杂交分析 *mPRL* mRNA 在繁殖相关组织的细胞学定位,发现 *mPRL* mRNA 分布在半滑舌鳎性成熟阶段卵巢的卵母细胞膜上;在脑的神经元和垂体内分散的细胞中, *mPRL* mRNA 阳性信号较强。制备半滑舌鳎 mPRL 的多克隆抗体,采用 Western blotting 方法检测半滑舌鳎 mPRL 蛋白在不同组织的表达特征,发现 mPRL 蛋白的表达量在卵巢、脑、垂体中相对较高,在肝脏、头肾、肾脏中表达量相对较少。免疫组化结果显示,半滑舌鳎 mPRL 蛋白在卵巢、脑和垂体的细胞学定位与 *mPRL* mRNA 定位一致。应用实时定量 PCR 和 Western blotting 方法检测促性腺激素调控下半滑舌鳎不同时相卵母细胞 *mPRL* 基因 mRNA 和蛋白的表达变化,结果显示,促性腺激素对半滑舌鳎卵母细胞中 *mPRL* 基因 mRNA 和蛋白表达都有一定的上调作用,特别是对 V 时相卵母细胞中 *mPRL* mRNA 和蛋白的表达量提升明显;发现表达量与促性腺激素调控作用具有剂量依存关系。半滑舌鳎 mPRL 在繁殖相关组织的表达特征表明其通过脑-垂体-卵巢轴参与繁殖调控,同时也揭示了 mPRL 介导卵母细胞成熟机制。

关键词 半滑舌鳎; 新型膜孕激素受体; 卵母细胞成熟; mRNA 表达; 蛋白表达
中图分类号 S197.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0010-08

孕激素脂联素受体(PAQRs)是具有 7 次跨膜结构的蛋白,广泛存在于古生菌、真细菌、线虫和哺乳动物(Lyons *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2005)。PAQRs 家族成员在不同物种具有高度保守性,表明此基因家族在进化过程中具有重要作用(Tang *et al.*, 2005)。关于

PAQRs 家族成员的膜拓扑结构、亚细胞定位、配基结合和信号传导机制一直存在争议。膜孕激素受体为 PAQRs 家族一个分支包含膜孕激素受体 α (mPR α)、膜孕激素受体 β (mPR β)和膜孕激素受体 γ (mPR γ)等,该受体家族在介导孕激素促进鱼类和两栖类卵母细

* 国家自然科学基金项目(31201982)、国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50)和山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2013SW042)共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31201982), China Agriculture Research System (CARS-50) and Shandong Youth Scientist Awards Foundation (BS2013SW042)]. 史宝, E-mail: shibao@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-11-05, 收修改稿日期: 2015-12-02

胞成熟、哺乳动物分娩等过程发挥重要作用(Zhu *et al.*, 2003; Karteris *et al.*, 2006; Josefsberg Ben-Yehoshua *et al.*, 2007)。在鲆鲽类中, 首次发现了牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)和半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)新型膜孕激素受体基因(*mPR-Like*, *mPRL*), 并分析该基因的分子特征(史宝, 2010¹⁾; 柳学周等, 2015); 根据半滑舌鲷基因组测序结果(Chen *et al.*, 2014), 其 *mPRL* 基因定位在 18 号染色体上。

针对半滑舌鲷苗种生产中大量使用的人工培育亲鱼, 时常出现产卵效果不佳、卵子质量差等现象(柳学周等, 2006), 柳学周等(2015)研究了半滑舌鲷功能基因 *mPRL* 表达规律, 发现在半滑舌鲷繁殖周期的脑和卵巢组织中, *mPRL* 的表达水平从性腺发育 II 期到 V 期持续升高, 并且在 V 期达到最高值; 从繁殖周期的垂体组织来看, 在性腺发育 V 期时, 垂体中的 *mPRL* 表达量达到峰值; 并且 *mPRL* 周期表达变化趋势与血清中孕酮激素含量变化规律一致。本研究分析了半滑舌鲷 *mPRL* 在卵子形成过程中母源的时序表达、繁殖相关组织 *mPRL* 的蛋白相对表达量和细胞学定位、促性腺激素调控 *mPRL* 基因和蛋白表达量的变化, 旨在为进一步阐明 *mPRL* 在半滑舌鲷卵母细胞成熟过程中的生理功能提供参考资料, 为提升人工亲鱼的培育技术和繁殖效率提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼和组织准备

实验用的性成熟半滑舌鲷雌鱼取自山东青岛忠海水产有限公司, 为野生亲鱼自然产卵后人工育苗得到的健康苗种经室内人工养成达到性成熟的 F₁ 亲鱼, 雌鱼全长为 53–66 cm, 体重为 1266.3–2271.0 g。其培育条件: 全年开放流水培育, 水温为 8–25℃, 盐度为 27–31, pH 为 7.8–8.4, 溶解氧>5 mg/L。按照半滑舌鲷卵巢发育的组织学特征, 将其卵巢发育分为 6 期(柳学周等, 2009; 陈彩芳等, 2010)。在性腺发育不同阶段采集雌鱼卵巢用于后续实验。对不同性腺发育时期半滑舌鲷卵巢卵母细胞进行分离, 从 IV 期卵巢分离到 EV、LV 和 FG 时相卵母细胞, 从 V 期卵巢分离到 PV、EV、LV 和 FG 时相卵母细胞, 卵母细胞时

相划分方法参考(李晓晓, 2013)²⁾。一部分卵母细胞样品用于促性腺激素调控实验, 一部分不处理作为对照, 实验结束后, 卵母细胞使用液氮速冻并在–80℃保存, 用于总 RNA 和总蛋白的提取。

在半滑舌鲷繁殖季节, 挑选性成熟雌鱼麻醉后取卵巢、脑、垂体组织样品, 在 4℃ 条件下使用 4% 多聚甲醛[溶于 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)中]固定 20 h, 梯度甲醇(25%、50%、75%和 100%甲醇溶于 0.01 mol/L PBS)脱水, 在–20℃保存于甲醇中的样品, 一部分用于免疫组化, 一部分用于原位杂交; 部分性腺组织固定在 Davidesons AFA 中, 用于检验性腺发育状况; 另外, 部分组织样品使用液氮速冻后保存在–80℃, 用于总蛋白的提取。

1.2 实时定量 PCR 检测

分别从半滑舌鲷 PV 时相、EV 时相、LV 时相、FG 时相和 GVBD 时相卵母细胞提取总 RNA 进行反转录, 并参照 PrimerScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(TaKaRa, 日本)合成 cDNA 第 1 链并用于基因表达分析。*mPRL* 引物序列为: 5′-TGTCCTCGTCCAGCGTCACT-3′(*mPRLF*)和 5′-CCCTGTC-CCAAGAAATCACACT-3′(*mPRLR*); 18S 引物序列为: 5′-GGTCTGTGATGCCCTTAGA TGTC-3′(18SF)和 5′-AGTGGGGTTCAGCGGGTTAC-3′(18SR)。荧光实时定量(qRT-PCR)的反应体系(20 μl): 1 μl cDNA 模板, 1.5 μl 引物(10 μmol/L), 10 μl SYBR Premix Ex Taq™ II 和 6 μl ddH₂O。采用 2 步法 PCR 扩增程序, 反应条件为 95℃ 预变性 30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 18 s 共 40 个循环。使用 18S rRNA 基因作为内参对照, 用以校正所有样品中 RNA 的量。荧光实时定量 PCR 反应及信息的收集都在 Mastercycler ep realplex 实时定量 PCR 仪(Eppendorf, 德国)上进行。程序运行完成后进行熔解曲线(Melting curve)分析以确定引物及反应是否正常。每个样品设置 3 个平行孔, 重复 3 次实验, 同时实验设阴性对照, 以保证实验结果的可靠性。

1.3 原位杂交

使用正向引物(5′-AAGCTTTCACACCTGCATG-GAAACG-3′)和反向引物(5′-GAATTCCCAAACATG-

1) Shi B. Study on the molecular mechanisms of reproductive endocrinology in *Paralichthys olivaceus* and *Paralichthys lethostigma*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2010, 1–176 [史宝. 牙鲆繁殖内分泌分子机理研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010, 1–176]

2) Li XX. Study on the physiological function of membrane progesterin receptor in the reproductive cycle of flatfish. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013, 1–73 [李晓晓. 膜孕激素受体在鲆鲽类繁殖周期中的生理功能研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 1–73]

ATTATTTCGGCT-3'), 扩增半滑舌鳎 *mPRL* 基因(GenBank Accession No. KF277065), 获得 600 bp 的 cDNA 片段。以此为模板, 使用地高辛试剂盒(Roche, 德国)体外转录合成 RNA 正义和反义探针。脑、卵巢、垂体组织固定在 4%多聚甲醛中, 经酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋, 样品连续切片, 厚度为 5 μm 。切片经二甲苯处理 2 次, 每次 5 min, 酒精梯度处理, 每次 5 min。PBST 冲洗 3 次, 每次 10 min。蛋白酶 K (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 10 min。PBST 冲洗 2 次, 每次 5 min。用预杂交液 70 $^{\circ}\text{C}$ 处理 3 h, 然后加入含有地高辛标记的 RNA 探针杂交液, 70 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 16 h。2 \times SSC 洗涤, 70 $^{\circ}\text{C}$, 15 min, 0.2 \times SSC, 70 $^{\circ}\text{C}$, 1 h。1 \times MAB 室温洗涤 5 min。血清室温封闭 6 h。1:500 封闭液稀释的抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBST 室温冲洗 6 次每次 15 min; 碱性磷酸缓冲液室温 2 次, 每次 10 min。加 20 μl 显色液 BCIP/NBT 室温避光显色。PBST 洗涤 5 次, 每次 5 min 终止反应, 4% PFA-PBS 固定 10 min, PBST 洗 3 次, 每次 5 min; 酒精梯度脱水、二甲苯透明, 封片, 使用 Nikon E80i 显微镜(日本)观察并拍照。

1.4 Western blotting

分析半滑舌鳎 *mPRL* 蛋白序列, 选择抗原表位, 并合成相应的免疫多肽; 将合成的多肽常规免疫新西兰大白兔, 制备抗体。冻存的脑、垂体、卵巢等组织(约 100 mg), 加入 1 ml 动物组织蛋白提取试剂, 匀浆、提取组织蛋白。12% SDS-PAGE 电泳检测提取蛋白的质量, 并使用蛋白测定试剂盒测定组织总蛋白浓度。统一蛋白上样量为 40 μg 。蛋白提取液经 12% SDS-PAGE 胶分离, 电转移到 PVDF 膜上, PBST 洗涤 2 次, 每次 5 min, 5% 脱脂奶粉封闭。一抗用制备的半滑舌鳎 *mPRL* 多克隆抗体, 稀释度为 1:2000; 二抗用辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG, 稀释度为 1:2000。DAB 显色, 凝胶成像系统拍照。同时采用空白对照检测多克隆抗体的特异性。使用软件对每个泳道的蛋白条带光密度值进行分析。

1.5 免疫组化

组织切片脱蜡复水, 3% H_2O_2 室温孵育 15 min, PBST 洗涤 2 次, 每次 15 min; 3% BSA 室温孵育 1 h, 封闭非特异性反应。滴加半滑舌鳎 *mPRL* 抗体, 稀释度为 1:1000, 湿盒中室温孵育过夜, PBST 洗涤 5 次, 每次 5 min。阴性对照组采用相同孵育方法, 滴加未免疫的兔血清。实验组和对照组均用 PBST 洗涤 5 次, 每次 5 min; 加入羊抗兔 IgG (1:1000) 室温孵育 1 h。DAB 显色 1-2 min。苏木精复染、脱水、透

明、封片, 使用 Nikon E80i 显微镜观察并拍照。

1.6 促性腺激素调控基因和蛋白表达

从半滑舌鳎不同发育阶段的卵巢分离出不同发育时相、未受损的卵母细胞。24 孔细胞培养板上每个孔放入 2 ml pH 为 7.6 的培养液(SIGMA, 美国), 培养液添加促性腺激素(hCG)(SIGMA, 美国)并使其终浓度为 10 IU/ml 或 20 IU/ml, 同时每个激素添加实验组相应设置 1 个空白对照组。卵母细胞经过 22 $^{\circ}\text{C}$ 6 h 培养后, 使用移液器将培养液移出, 收集卵母细胞迅速放入液氮中冻存, 用于 mRNA 和蛋白表达分析。

1.7 统计分析

基因表达实验所得数据用相对定量的 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法(Livak *et al*, 2001)计算后, 使用 SPSS 17.0 软件的单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Duncan's 多重比较分析。 $P < 0.05$ 为差异显著。相对表达量数据均表示为平均数 \pm 标准误(Mean \pm SE)。蛋白表达水平检测采用 AIC.AlphaView 成像分析系统(Cell Biosciences Inc)分析灰度值。

2 结果

2.1 *mPRL* 蛋白表达量

通过 Western blotting 方法检测半滑舌鳎 *mPRL* 蛋白在不同组织的表达水平。结果显示, 在卵巢、脑、垂体、肝脏、头肾和肾脏组织检测到蛋白条带, 分子量约为 100 kDa, 是理论值(40 kDa)的 2 倍多, 可能形成了蛋白二聚体; 对照组(PB)采用多肽抗原进行 Western blotting, 证实了抗体特异性(图 1-A)。半滑舌鳎 *mPRL* 蛋白表达量在卵巢、脑、垂体中相对较高, 在肝脏、头肾、肾脏中也有表达, 但表达量相对较少(图 1-B)。在卵巢、脑和垂体等较高水平表达, 说明 *mPRL* 在半滑舌鳎多种组织中参与调节孕激素生理功能。

2.2 卵子形成过程中 *mPRL* 的时序表达

对半滑舌鳎卵巢各发育期中, 不同发育时相的卵母细胞 *mPRL* mRNA 的相对表达量的分析结果显示, 在发育 IV 期的卵巢中, 处于卵黄生成后期卵母细胞(LV)的 *mPRL* mRNA 表达量最高($P < 0.05$); 在发育 V 期的卵巢, 即将进入成熟期卵母细胞(FG)的 *mPRL* mRNA 表达量最高($P < 0.05$)(图 2)。总体来看, 半滑舌鳎卵母细胞 *mPRL* mRNA 相对表达量的最高值出现在卵巢发育 V 期进入成熟期的卵母细胞($P < 0.05$), 表明此阶段 *mPRL* 基因的生理学作用效果最明显, *mPRL* 基因在卵母细胞成熟过程中起着重要的调控作用。

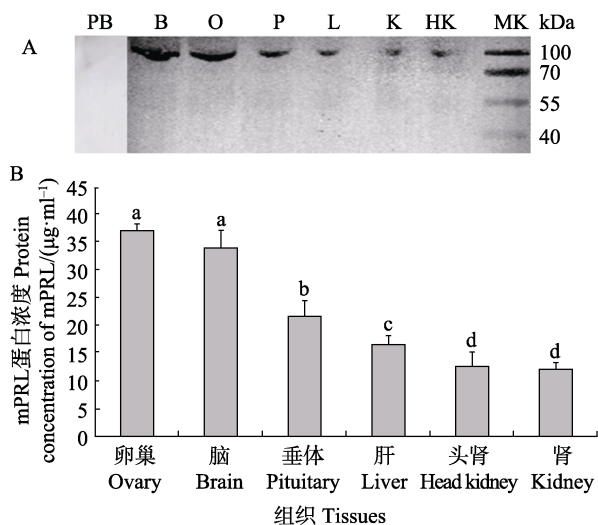


图 1 半滑舌鳎各组织 *mPRL* 蛋白的表达

Fig.1 Expression of *mPRL* protein in different tissues detected by Western blotting

A: *mPRL* 蛋白表达电泳图; B: *mPRL* 蛋白表达量化
O: 卵巢; B: 脑; P: 垂体; L: 肝; HK: 头肾; K: 肾;
MK: 蛋白分子量标准; PB: 阴性对照; 不同字母代表差异显著($P < 0.05$), 下同

A: Electrophoregram of protein expression for *mPRL*;
B: Quantitative abundance of *mPRL* protein expression
O: Ovary; B: Brain; P: Pituitary; L: Liver; HK: Head kidney;
K: Kidney; MK: Protein molecular weight marker;
PB: Peptide block; The values with different letters differ significantly from each other ($P < 0.05$), the same as below

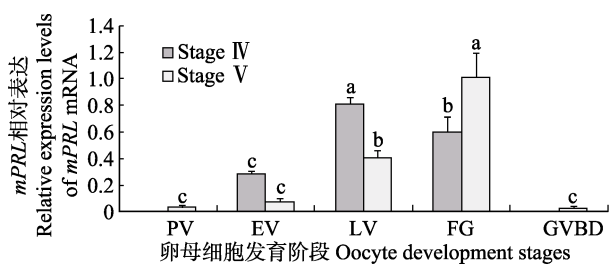


图 2 半滑舌鳎不同卵巢发育时期的不同时相卵母细胞 *mPRL* 基因的表达

Fig.2 The relative expression of *mPRL* mRNA at various stages of oogenesis at different ovary stages of *C.semilaevs* ($n=3$)

PV: 卵黄发生前卵母细胞; EV: 卵黄发生早期卵母细胞;
LV: 卵黄生成后期卵母细胞; FG: 即将进入成熟阶段卵母细胞;
GVBD: 生发泡破裂阶段卵母细胞。下同

PV: Previtellogenic stage; EV: Early vitellogenic stage;
LV: Late vitellogenic stage; FG: Full grown stage;
GVBD: Germinal vesicle breakdown stage. The same as below

2.3 *mPRL* 基因的细胞学定位

原位杂交分析 *mPRL* mRNA 在繁殖相关组织中的细胞学定位结果显示, 在半滑舌鳎卵巢、脑和垂

体组织中有明显的杂交信号(图 3)。在发育成熟的卵巢中, *mPRL* mRNA 在卵母细胞膜上可观察到较强的阳性信号(图 3-A)。将成熟卵巢图像(图 3-A)放大 1000 倍, 可清楚看到阳性信号定位在卵母细胞膜上(图 3-1)。在脑组织中, *mPRL* mRNA 在脑组织神经元表达, 在脑组织内 *mPRL* mRNA 阳性信号强度降低(图 3-B)。将脑组织图像(图 3-B)放大 1000 倍, 可看到阳性信号明显定位在脑组织(图 3-2)。在垂体组织中, *mPRL* mRNA 阳性信号在分散的细胞中表达较弱(图 3-C)。图 3-a、图 3-b 和图 3-c 分别为相应组织的阴性对照。

2.4 *mPRL* 蛋白的细胞学定位

免疫组化结果显示, 半滑舌鳎 *mPRL* 在卵巢、脑和垂体的细胞学定位与 *mPRL* mRNA 一致。在性成熟卵巢组织中, *mPRL* 主要在卵母细胞膜上表达丰富(图 4-A); 放大 1000 倍后(图 4-1), 可以很明显看出其在膜附近的表达。在脑组织中, *mPRL* 主要定位在脑组织的神经元(图 4-B); 图 4-2 为放大 1000 倍的表达结果。在垂体组织中, *mPRL* 主要分布在垂体中分散的细胞(图 4-C); 图 4-3 为放大 1000 倍的表达结果。图 4-a、图 4-b 和图 4-c 分别为相应组织的阴性对照。

2.5 促性腺激素调控不同发育时相卵母细胞 *mPRL* mRNA 和蛋白的表达

促性腺激素孵育不同时相的半滑舌鳎卵母细胞 6 h 后, 采用实时荧光定量 PCR 和 Western blotting 方法检测半滑舌鳎 *mPRL* 基因和蛋白的表达变化。结果显示, 10 IU/ml 和 20 IU/ml 促性腺激素对半滑舌鳎卵母细胞中 *mPRL* 基因和蛋白表达都有一定的促进作用(图 5 和图 6-A), 特别是对即将进入成熟阶段(FG)的卵母细胞中 *mPRL* 基因和蛋白的表达量提升明显($P < 0.05$)(图 5 和图 6-B); 促性腺激素通过 *mPRL* 提升了卵母细胞的减数分裂成熟能力。结果表明, *mPRL* 和卵母细胞成熟存在密切关系。此外, 20 IU/ml 促性腺激素对 *mPRL* 基因和蛋白表达的调控作用比 10 IU/ml 促性腺激素作用更明显, 表明 *mPRL* 基因和蛋白表达对促性腺激素调控作用存在剂量依存关系。

3 讨论

3.1 卵子形成过程中 *mPRL* 时序表达分析

qRT-PCR 检测发现, 在半滑舌鳎不同组织中, *mPRL* mRNA 在卵巢组织的表达丰富(柳学周等, 2015)。为进一步分析 *mPRL* 在半滑舌鳎卵巢的作用机制, 本研究检测 *mPRL* 基因在半滑舌鳎不同时相卵母细胞表达规律, 发现 *mPRL* 随着卵母细胞发育, 表

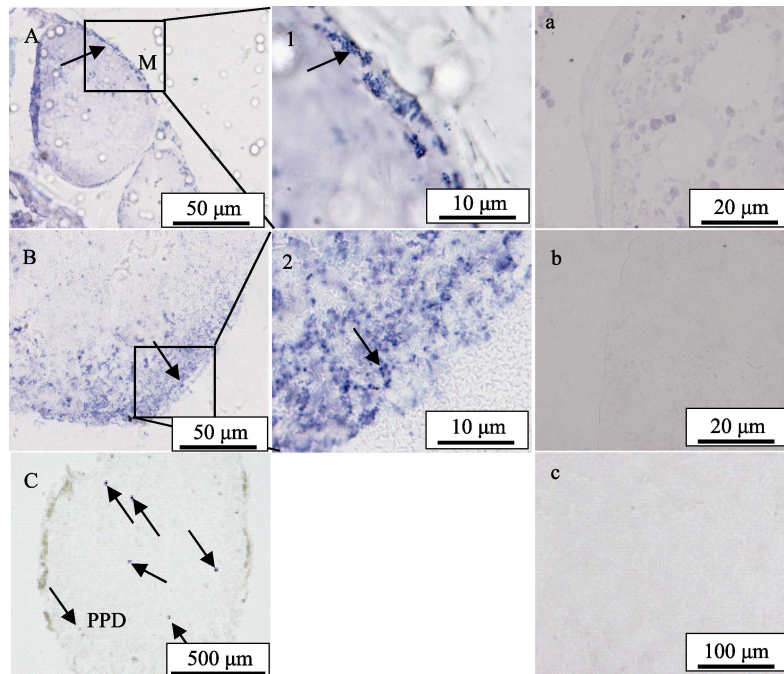


图3 半滑舌鳎 *mPRL* 基因在不同组织中的细胞学定位

Fig.3 Localization of *mPRL* mRNA in different tissues of *C.semilaevis* detected by *in situ* hybridization

A: 卵巢; 1: 卵巢($\times 1000$); a: 卵巢对照组; B: 脑; 2: 脑($\times 1000$); b: 脑对照组; C: 垂体; c: 垂体对照组;

M: 卵母细胞膜; PPD: 垂体中外侧部; 箭头指向为阳性信号位置

A: Ovary; 1: Ovary ($\times 1000$); a: Negative control of ovary; B: Brain; 2: Brain ($\times 1000$); b: Negative control of brain; C: Pituitary; c: Negative control of pituitary; M: Oocyte membrane; PPD: Proximalis pars distalis; The arrows indicated the positive reaction

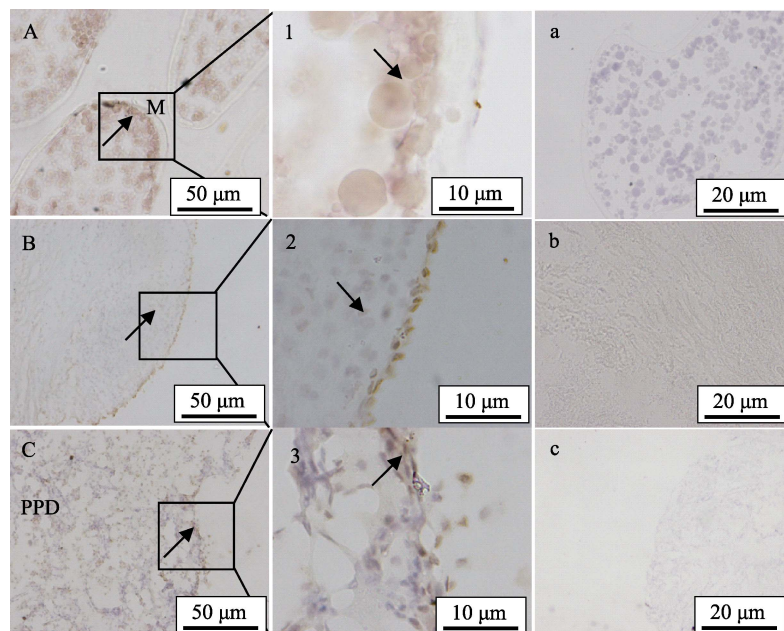


图4 半滑舌鳎 *mPRL* 蛋白在各组织中的细胞定位

Fig.4 Localization of *mPRL* protein in the ovary, brain and pituitary of *C.semilaevis* demonstrated by immunohistochemistry

A: 卵巢; 1: 卵巢($\times 1000$); a: 卵巢对照组; B: 脑; 2: 脑($\times 1000$); b: 脑对照组; C: 垂体; 3: 垂体($\times 1000$);

c: 垂体对照组; M: 卵母细胞膜; PPD: 垂体中外侧部; 箭头指向为阳性信号位置

A: Ovary; 1: Ovary ($\times 1000$); a: Negative control of ovary; B: Brain; 2: Brain ($\times 1000$); b: Negative control of brain;

C: Pituitary; 3: Pituitary ($\times 1000$); c: Negative control of pituitary; M: Oocyte membrane; PPD: Proximalis pars distalis;

The arrows indicated the positive reaction

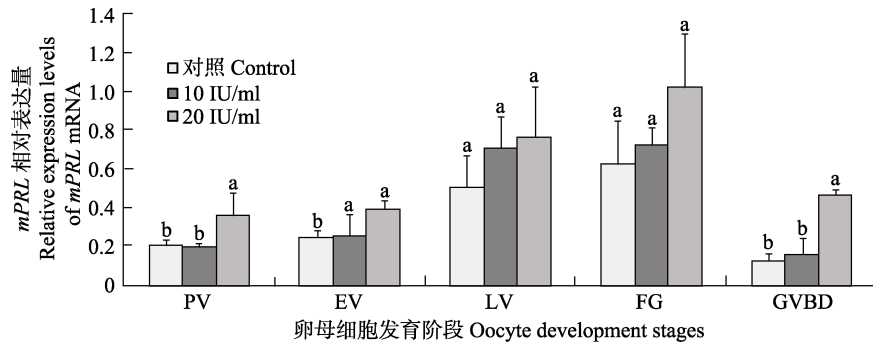


图 5 不同浓度促性腺激素调控半滑舌鳎不同时相卵母细胞 *mPRL* 表达

Fig.5 The relative expression of *mPRL* mRNA in isolated oocytes at various stages of oogenesis of *C. semilaevis* following different hCG treatment

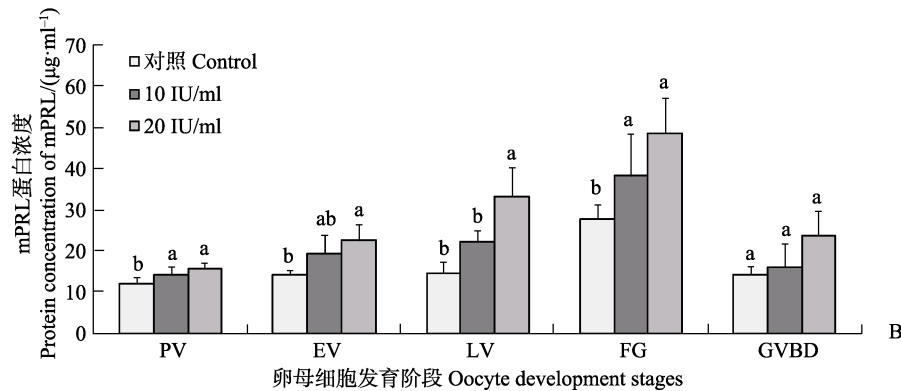
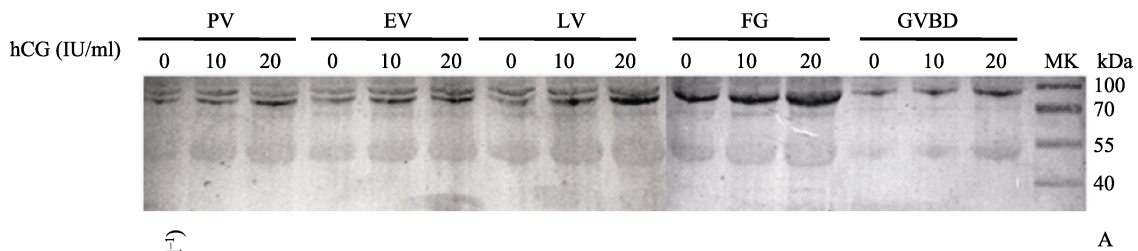


图 6 不同浓度促性腺激素调控不同时相卵母细胞 *mPRL* 蛋白表达

Fig.6 Changes of *mPRL* protein levels in isolated oocytes at various stages of oogenesis following hCG treatment detected by Western blotting analysis with a polyclonal *mPRL* antibody

A: *mPRL* 蛋白表达量电泳; B: *mPRL* 蛋白表达量化; 0: 对照组; 10: 10 IU/ml hCG 处理组; 20: 20 IU/ml hCG 处理组

A: Electrophoregram of protein expression for *mPRL*; B: Quantitative abundance of *mPRL* protein expression;

0: Control group; 10: hCG (10 IU/ml) treatment group; 20: hCG (20 IU/ml) treatment group

达水平逐步升高。在发育IV期的卵巢中,处于卵黄生成后期卵母细胞的 *mPRL* 基因表达量最高;在发育V期的卵巢中,处于FG时相卵母细胞的 *mPRL* 基因表达量最高。总体来看, *mPRL* mRNA 在卵黄生成早期的卵母细胞表达,可能参与卵黄生成过程;而在卵黄生成后期和即将进入成熟阶段的卵母细胞中 *mPRL* mRNA 迅速增加,表明 *mPRL* 基因和卵母细胞成熟存在密切关系。

3.2 *mPRL* 的表达与定位分析

Western blotting 结果发现, *mPRL* 蛋白表达量在半滑舌鳎的卵巢、脑、垂体中相对较高,明显的蛋白

免疫反应条带出现在大约 100 kDa 位置,推测可能是形成了 *mPRL* 二聚体。膜孕激素受体家族成员蛋白二聚体形式比较常见,如在金鱼(*Carassius auratus*)不同组织和人类精子膜上,Western blotting 分析发现类似情况, *mPR α* 蛋白条带出现在大约 80 kDa 位置(Thomas *et al.*, 2004; Tokumoto *et al.*, 2006)。半滑舌鳎 *mPRL* 基因和蛋白在繁殖内分泌相关组织较丰富的表达并在卵巢组织表达量最大,该结果进一步说明 *mPRL* 主要调控卵巢的生理功能。

为探索 *mPRL* 的生理学作用,本研究分析了 *mPRL* 基因和蛋白的细胞学定位。原位杂交和免疫组化实验结果提供了清晰的组织细胞学证据, *mPRL* 基

因和蛋白阳性信号明显地分布在性成熟卵巢的卵母细胞膜上,并在脑的神经元和垂体内分散的细胞上分布。在半滑舌鲷卵母细胞发育过程中, *mPRL* 基因表达增强,结合 *mPRL* 基因和蛋白在成熟卵母细胞膜上的定位,说明 *mPRL* 是受内分泌调控的介导卵母细胞成熟的膜受体。孕激素在神经系统具有重要的生理功能,如调节促性腺激素释放激素(GnRH)释放、繁殖行为、神经保护作用等(Baudry *et al*, 2013; Petersen *et al*, 2013)。赵明(2011)¹⁾通过 qRT-PCR 方法分析 GnRH 基因在雌性半滑舌鲷各组织的分布时发现, *GnRH* mRNA 在垂体和脑组织表达较丰富。因此,在本研究中发现的 *mPRL* 在半滑舌鲷神经内分泌相关组织垂体和脑的分布,表明 *mPRL* 可能介导孕激素调节 GnRH 释放,进而影响半滑舌鲷繁殖。

3.3 *mPRL* 作用机制分析

采用 2 种不同浓度促性腺激素孵育不同发育阶段的卵母细胞,发现 *mPRL* 基因和蛋白水平显著提高;本研究中,上调 *mPRL* 的表达可能与增强半滑舌鲷卵母细胞对孕激素应答能力以及完成卵母细胞减数分裂成熟有关。柳学周等(2014、2015)研究发现,雌性半滑舌鲷血清中促黄体激素(LH)和孕激素的浓度从 II 到 V 期卵巢逐渐上升,在 V 期卵巢达到最高水平;这 2 种激素的变化趋势与本研究中 *mPRL* 基因和蛋白在卵母细胞表达的变化趋势相似,表明 *mPRL* 可能通过介导孕激素诱导卵母细胞成熟。在对金鱼和大西洋绒须石首鱼(*Micropogonias undulatus*)的研究中发现,促性腺激素孵育卵母细胞, *mPR α* 蛋白水平升高;上调的卵母细胞 *mPR α* 蛋白水平与卵母细胞成熟相关(Zhu *et al*, 2003; Tokumoto *et al*, 2006)。半滑舌鲷 *mPRL* 与其他鱼类的 *mPR α* 类似的表达模式,预示着 *mPRL* 和 *mPR α* 基因可能在卵巢具有相似的生理功能。综合近年来的研究结果(柳学周等, 2014、2015; Shi *et al*, 2015; 王珊珊等, 2013; 李晓晓等, 2013; 赵明, 2011¹⁾),半滑舌鲷卵母细胞成熟机制表现为:下丘脑分泌 GnRH, GnRH 通过神经内分泌途径刺激垂体释放 LH, LH 卵巢滤泡细胞分泌孕激素,进而孕激素通过 *mPRL* 介导作用于卵母细胞,促使卵母细胞成熟。这为进一步研究半滑舌鲷 *mPRL* 作用机制和其生产应用提供了理论依据。

参 考 文 献

Baudry M, Bi X, Aguirre C. Progesterone-estrogen interactions

in synaptic plasticity and neuroprotection. *Neuroscience*, 2013, 239: 280–294

Chen CF, Wen HS, Chen XY, *et al*. Studies on ovarian development and spawn type of cultured half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*. *Marine Sciences*, 2010, 34(8): 29–34 [陈彩芳, 温海深, 陈晓燕, 等. 人工养殖半滑舌鲷卵巢发育及其产卵类型研究. *海洋科学*, 2010, 34(8): 29–34]

Chen SL, Zhang GJ, Shao, CW, *et al*. Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. *Nature Genetics*, 2014, 46(3): 253–260

Josefsberg Ben-Yehoshua L, Lewellyn AL, Thomas P, *et al*. The role of Xenopus membrane progesterone receptor β in mediating the effect of progesterone on oocyte maturation. *Molecular Endocrinology*, 2007, 21(3): 664–673

Karteris E, Zervou S, Pang Y, *et al*. Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein coupled receptors: Potential role in functional progesterone withdrawal at term. *Molecular Endocrinology*, 2006, 20(7): 1519–1534

Li XX, Liu XZ, Shi B, *et al*. Cloning and mRNA expression pattern of common glycoprotein α subunit of GTH in tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(5): 23–30 [李晓晓, 柳学周, 史宝, 等. 半滑舌鲷促性腺激素 α 亚基 cDNA 的克隆及组织表达特征. *渔业科学进展*, 2013, 34(5): 23–30]

Liu XZ, Sun ZZ, Ma AJ, *et al*. Study on the technology of spawner culture and eggs collection of *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Marine Fisheries Research*, 2006, 27(2): 25–32 [柳学周, 孙中之, 马爱军, 等. 半滑舌鲷亲鱼培育及采卵技术研究. *海洋水产研究*, 2006, 27(2): 25–32]

Liu XZ, Shi B, Li XX, *et al*. Molecular characterization of the novel membrane progesterone receptor gene and its role during ovarian development in the half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(4): 608–619 [柳学周, 史宝, 李晓晓, 等. 半滑舌鲷新型膜孕激素受体基因分子特征及其在卵巢发育过程的作用. *中国水产科学*, 2015, 22(4): 608–619]

Liu XZ, Shi B, Wang SS, *et al*. Full length cDNA cloning and expression of luteinizing hormone (LH) and which serum concentration was measured in half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Engineering Sciences*, 2014, 16(9): 50–60 [柳学周, 史宝, 王珊珊, 等. 半滑舌鲷促黄体激素基因克隆和表达分析及其血清浓度测定. *中国工程科学*, 2014, 16(9): 50–60]

Liu XZ, XU YJ, Liu NZ, *et al*. Study on histological and morphometric characters of gonad development of *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(6): 25–35 [柳学周, 徐永江, 刘乃真, 等. 半滑舌鲷卵巢发育的组织学和形态数量特征研究. *渔业科学进展*, 2009, 30(6): 25–35]

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408

Lyons TJ, Villa NY, Regalia LM, *et al*. Metalloregulation of yeast membrane steroid receptor homologs. *Proceedings of*

1) Zhao M. Studies on reproductive physiological characteristics and molecular cloning of cGnRH-II in tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* Günther. Master's Thesis of Ocean University of China, 2011, 1–79 [赵明. 半滑舌鲷生殖生理特性及 GnRH 克隆初步研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2011, 1–79]

- the National Academy Sciences, 2004, 101(15): 5506–5511
- Petersen SL, Intlekofer KA, Moura-Conlon PJ, *et al.* Novel progesterone receptors: Neural localization and possible functions. *Frontiers in Neuroscience*, 2013, 7: 1–7
- Shi B, Liu XZ, Xu YJ, *et al.* Molecular characterization of three gonadotropin subunits and their expression patterns during ovarian maturation in *Cynoglossus semilaevis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(2): 2767–2793
- Tang YT, Hu T, Arterburn M, *et al.* PAQR proteins: Novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif. *Journal of Molecular Evolution*, 2005, 61(3): 372–380
- Thomas P, Pang Y, Zhu Y, *et al.* Multiple rapid progesterin actions and progesterin membrane receptor subtypes in fish. *Steroids*, 2004, 69(8–9): 567–573
- Tokumoto M, Nagahama Y, Thomas P, *et al.* Cloning and identification of a membrane progesterin receptor in goldfish ovaries and evidence it is an intermediary in oocyte meiotic maturation. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 145(1): 101–108
- Wang SS, Liu XZ, Shi B, *et al.* Full length cDNA cloning and tissue expression analysis of follicle-stimulating hormone (FSH) from half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(6): 15–23 [王珊珊, 柳学周, 史宝, 等. 半滑舌鲷促滤泡激素基因全长 cDNA 的克隆与组织表达分析. *渔业科学进展*, 2013, 34(6): 15–23]
- Zhu Y, Rice CD, Pang Y, *et al.* Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocyte. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 2003, 100(5): 2231–2236

(编辑 马璀艳)

Expression Characterization of the Novel Membrane Progesterin Receptor (mPR-Like) Gene During the Oocyte Maturation of Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)

SHI Bao^{1,2}, LIU Xuezhou^{1,2}①, XU Tao³, LI Xiaoni¹, XU Yongjiang^{1,2}, ZHANG Jinyong¹

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao, 266071; 3. Shandong Province Fisheries Technology Extension Station, Jinan 250013)

Abstract This research focuses on the expression characteristics and mechanism of the novel membrane progesterin receptor-like (mPR-Like, mPRL) gene of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) to improve the technique of artificial breeding. In the present study, using the quantitative real-time PCR (qRT-PCR) assays, the *mPRL* mRNA expression levels were measured in the isolated oocytes during different stages of oogenesis. With the oocyte development, the *mPRL* transcript levels of oocytes significantly increased from stage II to stage V and reached the peak at stage V. The spatial expression of *mPRL* mRNA in the ovary, pituitary and brain of *C. semilaevis* was demonstrated using *in situ* hybridization. Results revealed that the *mPRL* expression was observed on the membrane of oocytes, and the positive signals were also observed in the scattered cells throughout the pituitary and in the brain neurons. Western blotting analysis identified the immunoreactive protein that bands in the ovary, brain, pituitary, liver, head kidney and kidney of *C. semilaevis*. However, the expression levels of the protein in the ovary, brain and pituitary were higher than other tissues. Immunohistochemistry detection revealed that the cellular localization of mPRL protein was similar with that of mRNA in *C. semilaevis*. The signals were observed in the scattered cells of pituitary and the brain neurons. The intensity of the positive signals was found in the membrane of oocyte. After incubation *in vitro* in the presence or absence of hCG, the *mPRL* mRNA and protein levels were measured in the oocytes at different developmental stages using qRT-PCR and western blotting analysis. In response to the hCG treatment, the *mPRL* mRNA and protein expression increased in a step-wise manner during follicle development, with the highest level detected in the stage V of oocytes. The mPRL expression characteristics at both transcript and protein levels implied that mPRL was involved in regulating the reproduction of female *C. semilaevis* through the brain-pituitary-ovary axis endocrine system. Moreover, the evidence supports that mPRL has a functional role in the oocyte maturation in *C. semilaevis* by acting as a mediator of progesterone.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; mPR-Like; Oocyte maturation; mRNA expression; Protein expression

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

性成熟雌性牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)新型膜孕激素受体(mPRL)的定性定量表达分析*



史 宝^{1,2} 柳学周^{1,2①} 徐 涛³ 李晓妮^{1,2} 徐永江^{1,2} 张金勇^{1,2}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室
海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 山东省渔业技术推广站 济南 250013)

摘要 在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)繁殖周期, 新型膜孕激素受体基因(mPR-Like, *mPRL*)在脑-垂体-性腺轴的表达变化规律与性腺发育成熟密切相关。为进一步研究牙鲆 *mPRL* 作用机制, 本研究对其 mRNA 和蛋白的表达特征进行了分析。应用实时定量 PCR 方法分析 *mPRL* mRNA 在卵子形成过程中的时序表达, 发现牙鲆 *mPRL* mRNA 相对表达量的最高值出现在性成熟阶段卵巢的 V 时相卵母细胞。原位杂交分析 *mPRL* mRNA 在繁殖相关组织中的细胞学定位, 发现 *mPRL* mRNA 主要分布在牙鲆性成熟阶段卵巢的卵母细胞膜上; 在脑组织的神经元附近区域 *mPRL* mRNA 阳性信号也较强。制备牙鲆 *mPRL* 的多克隆抗体, 采用 Western blotting 方法检测牙鲆 *mPRL* 蛋白在不同组织的表达特性, 发现 *mPRL* 蛋白表达量在卵巢和脑组织中相对较高, 在肝脏、头肾、肾脏中表达量相对较少。免疫组化结果显示, 牙鲆 *mPRL* 蛋白在卵巢和脑组织的细胞学定位与 *mPRL* mRNA 定位一致。牙鲆 *mPRL* 在繁殖相关组织的表达特征说明其参与卵母细胞成熟的过程, 并通过内分泌方式参与牙鲆的繁殖调控。

关键词 牙鲆; 新型膜孕激素受体; mRNA 表达; 蛋白表达

中图分类号 S197.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2017)01-0018-07

在高等哺乳动物中, 关于膜孕激素受体(mPRs)组织表达和生理学作用研究较多, 而对低等脊椎动物膜孕激素受体表达特征和组织定位研究较少(Hasegawa *et al*, 2005; Zhu *et al*, 2008; 史宝等, 2013)。孕激素参与繁殖的所有环节, 但在繁殖相关器官卵巢、精巢和脑等的作用机制尚不清楚, 多种受体参与孕激素信号传导, 并且由于高等动物的生殖系统复杂, 使得相关的研究不易于开展(Mulac-Jericovic *et al*, 2004; Fernandes *et al*, 2005)。牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)人工繁育技术成熟、怀卵量大, 是研究孕激

素调控繁殖机制很好的实验材料。鱼类卵母细胞在卵黄生成阶段完成后体积增大, 停滞在有丝分裂前期。大量分泌的促性腺激素刺激卵巢滤泡细胞释放成熟诱导类固醇激素即孕激素, 孕激素促使鱼类卵母细胞减数分裂重新开始, 与膜孕激素受体结合, 促进卵母细胞成熟(Nagahama *et al*, 2008)。

膜孕激素受体具有和 G 蛋白偶联受体(GPCRs)相似的跨膜结构域, 但是, 膜孕激素受体属于孕激素脂联素受体家族(PAQR)成员(Tang *et al*, 2005)。孕激素相关的膜受体主要包括膜孕激素受体(mPR α 、

* 国家自然科学基金项目(31201982)、国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50)和山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2013SW042)共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31201982), China Agricultural Research System (CARS-50) and Shandong Youth Scientist Awards Foundation (BS2013SW042)]. 史 宝, E-mail: shibao@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-12-13, 收修改稿日期: 2016-01-12

mPR β 和mPR γ)和孕酮受体膜组成部分(PGMRCs)等,该受体家族在诱导鱼类和两栖类卵母细胞成熟、哺乳动物分娩等过程中发挥重要作用(Karteris *et al*, 2006; Josefsberg Ben-Yehoshua *et al*, 2007)。在牙鲆中,文献曾报道了 PAQR 家族一个新成员(mPR-Like, mPRL);组织特异性表达分析显示, mPRL mRNA 在牙鲆卵巢、精巢、脑等繁殖相关器官表达丰富;在牙鲆精巢和卵巢发育 期时, mPRL mRNA 表达水平逐步升高并在 期达到整个繁殖期最大值($P < 0.05$),从 期到 期, mPRL 转录水平下降,该基因相对表达量变化与性腺发育状态密切相关;但 mPRL 的蛋白结构和精确作用机制等仍不清楚(史宝, 2010¹⁾;李晓晓, 2013²⁾)。本研究采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)、免疫印迹和免疫组织化学方法,在 mRNA 和蛋白质水平揭示牙鲆 mPRL 的表达特性和细胞学定位,为揭示牙鲆 mPRL 的表达特征、探讨其调控卵母细胞成熟机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼和组织准备

实验用牙鲆雌鱼采自山东青岛忠海水产有限公司,为野生亲鱼自然产卵后人工育苗得到的健康苗种,经室内人工养殖达到性成熟的 F₁ 代亲鱼。牙鲆雌鱼全长为 40–60 cm,体重为 1428.7–2508.3 g。其培育条件:全年开放流水培育,水温为 8–25℃,盐度为 27–31, pH 为 7.8–8.4,溶解氧 > 5 mg/L。在牙鲆繁殖季节,挑选腹部膨大、松软的亲鱼,使用 MS-222 麻醉雌鱼后解剖。按照牙鲆卵巢发育的组织学特征,在显微镜下将卵母细胞按时相分类取样,从发育 期卵巢分离到 时相、 时相、 时相和 时相卵母细胞,用液氮将卵母细胞速冻并在 -80℃ 保存,用于总 RNA 提取。雌鱼麻醉后解剖,留取各组织样品,在 4℃ 条件下,4%多聚甲醛[溶于 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)中]固定 20 h,梯度甲醇(25%、50%、75%和 100% 甲醇溶于 0.01 mol/L PBS)脱水,在 -20℃ 保存于甲醇中的样品,一部分用于免疫组化,一部分用于原位杂交;部分性腺组织用 Davidesons AFA 固定,用于检验性腺发育状况;使用液氮速冻后保存在 -80℃

的组织样品,用于总蛋白的提取。

1.2 实时荧光定量 PCR 检测

对牙鲆 mPRL mRNA 在不同发育阶段卵母细胞的表达进行分析。每个卵母细胞发育时相设置 4 个重复,分别提取 时相、 时相、 时相、 时相和 时相卵母细胞的总 RNA,进行反转录,并使用 PrimerScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(TaKaRa, 日本)合成 cDNA 第 1 链,用于基因表达分析。使用 β -actin 基因作为 qRT-PCR 的内参基因。牙鲆 mPRL 引物序列为:5'-CAATCAACGAGGGTGC-GTAAG-3'(mPRLF)和 5'-AAAGAGAACGGCTTGG-TCACTG-3'(mPRLR); β -actin 引物序列为:5'-GAAA-TCGCCGACTGGTT-3'(β -actinF)和 5'-GCCCATAC-CCACCATCACTC-3'(β -actinR)。qRT-PCR 反应体系(20 μ l): 1 μ l cDNA 模版, 1.5 μ l 引物(10 μ mol/L), 10 μ l SYBR Premix Ex Taq™ 和 6 μ l dH₂O。采用两步法 PCR 扩增程序,反应条件:95℃ 预变性 30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 18 s 共 40 个循环。qRT-PCR 反应及信息的收集都在 Mastercycler ep realplex 实时定量 PCR 仪(Eppendorf, 德国)上进行。程序运行完成后进行熔解曲线(Melting curve)分析以确定引物及反应是否正常。每个样品设置 3 个平行孔,重复 3 次实验,同时设阴性对照,以确认实验结果的可靠性。

1.3 原位杂交(ISH)

使用正向引物(5'-AAGCTTAGACACCGAGGT-TCCCGCTTAT-3')和反向引物(5'-GAATTCGAGGAT-GGTGGCAACAGGCA-3'),扩增牙鲆 mPRL 基因(GenBank Accession No. KM507040),获得 440 bp 的 cDNA 片段。以此为模板,使用地高辛试剂盒(Roche, 瑞士)体外转录合成正义和反义 RNA 探针。牙鲆卵巢和脑组织在 4%多聚甲醛中固定,经脱水、透明、包埋、切片。切片经二甲苯处理 2 次,每次 5 min,酒精梯度处理,每次 5 min。PBST 冲洗 3 次,每次 10 min。蛋白酶 K(10 μ g/ml) 37℃ 消化 10 min。PBST 冲洗 2 次,每次 5 min。用预杂交液 70℃ 处理 3 h,然后加入含有地高辛标记的 RNA 探针的杂交液,70℃ 杂交 12 h。2 \times SSC 洗涤,70℃ 孵育 15 min; 0.2 \times SSC, 70℃

1) Shi B. Study on the molecular mechanisms of reproductive endocrinology in *Paralichthys olivaceus* and *Paralichthys lethostigma*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2010, 1–176 [史宝. 牙鲆繁殖内分泌分子机理研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010, 1–176]

2) Li XX. Study on the physiological function of membrane progesterin receptor in the reproductive cycle of flatfish. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013, 1–73 [李晓晓. 膜孕激素受体在鲆鲽类繁殖周期中的生理功能研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 1–73]

孵育 1 h。1×MAB 室温洗涤 5 min。血清室温封闭 6 h。1:500 封闭液稀释的抗体 4℃ 孵育过夜。PBST 室温冲洗 6 次, 每次 15 min; 碱性磷酸缓冲液室温洗涤 (2 次) 每次 10 min。加 20 μl 显色液 (BCIP/NBT) 室温避光显色。PBST 洗涤 5 次, 每次 5 min, 终止反应。4%PFA-PBS 固定 10 min, PBST 洗 3 次, 每次 5 min; 酒精梯度脱水、二甲苯透明, 封片, 使用 Nikon E80i 显微镜观察并拍照。

1.4 Western blotting

分析牙鲈 *mPRL* 蛋白序列, 选择抗原表位, 合成相应的免疫多肽; 多肽常规免疫新西兰大白兔, 制备抗体。冻存的牙鲈卵巢、脑、头肾、肾和肝组织 (约 100 mg), 各加入 1 ml 动物组织蛋白提取试剂, 匀浆、提取组织蛋白。12% SDS-PAGE 电泳检测所提取的蛋白, 并使用蛋白测定试剂盒测定组织总蛋白浓度。统一蛋白上样量为 40 μg。蛋白提取液经 12% SDS-PAGE 胶分离, 电转移到 PVDF 膜上, PBST 洗涤 (2 次) 每次 5 min, 以 5% 脱脂奶粉封闭。一抗用制备的牙鲈 *mPRL* 多克隆抗体, 稀释度为 1:2000; 二抗用辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG, 稀释度为 1:2000。DAB 显色, 凝胶成像系统拍照。使用软件对每个泳道的蛋白条带光密度值进行分析。

1.5 免疫组化

组织切片脱蜡复水, 3% H₂O₂ 室温孵育 15 min, PBST 洗涤 2 次, 每次 15 min; 3% BSA 室温孵育 1 h, 封闭非特异性反应。滴加牙鲈 *mPRL* 抗体, 稀释度为 1:1000, 湿盒中室温孵育过夜, PBST 洗涤 5 次, 每次 5 min。利用羊抗兔 IgG (1:1000) 作为阴性对照, 孵育方法相同, 室温孵育 1 h。DAB 显色 1-2 min。苏木精复染、脱水、透明、封片, 使用 Nikon E80i 显微镜观察并拍照。

1.6 统计分析

基因表达实验所得数据用相对定量的 2^{-ΔΔCT} 方法 (Livak *et al.*, 2001) 计算后, 使用 SPSS 17.0 软件的单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行数据处理。*P*<0.05 为差异显著。相对表达量数据均表示为平均值±标准误 (Mean±SE), 并制成柱状图。蛋白表达水平检测采用 AIC.AlphaView 成像分析系统 (Cell Biosciences Inc) 分析灰度值, 并制成柱状图。

2 结果

2.1 卵子形成过程中 *mPRL* 的时序表达

qRT-PCR 的结果显示, 在牙鲈卵巢发育 V 期,

mPRL 基因在卵母细胞不同发育阶段均有表达, 但其表达量有显著差异。*mPRL* 基因的表达水平从 II 时相到 V 时相卵母细胞持续显著升高, 而在 VI 时相卵母细胞表达水平迅速下降 (*P*<0.05)。*mPRL* 基因在卵母细胞成熟阶段表达水平达到峰值, 这表明 *mPRL* 基因参与卵母细胞的成熟过程 (图 1)。

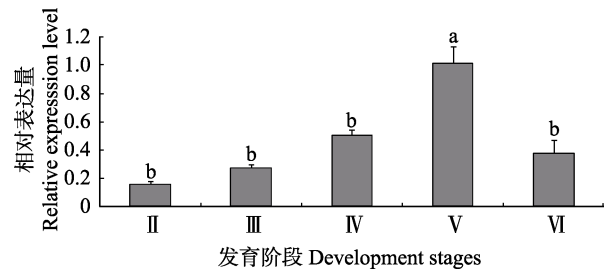


图 1 *mPRL* mRNA 在牙鲈不同时相卵母细胞的表达
Fig.1 Relative expression levels of *mPRL* mRNA at various stages of oogenesis (n=4)

不同字母表示差异显著 (*P*<0.05), 下同
Different letters indicated significant different (*P*<0.05), the same as below

2.2 *mPRL* 基因的细胞学定位

原位杂交分析 *mPRL* mRNA 在牙鲈繁殖相关组织中的细胞学定位结果显示, 在卵巢和脑组织有明显的杂交信号 (图 2)。在牙鲈发育成熟的卵巢中, *mPRL* mRNA 在卵母细胞膜上表达丰富 (图 2-A), 将该区域放大, 可观察到较强的阳性信号 (图 2-1), 预示了其作为膜受体行使生理功能。在牙鲈脑组织中, *mPRL* mRNA 在脑组织神经元表达 (图 2-B), 局部放大后显示阳性信号较强 (图 2-2)。图 2-a 和图 2-b 为相应组织原位杂交分析的阴性对照。

2.3 *mPRL* 蛋白表达量

通过 Western blotting 方法检测牙鲈 *mPRL* 蛋白在不同组织的表达水平。结果显示, 在卵巢、脑、头肾、肾脏和肝脏检测到蛋白条带, 分子量约为 50 kDa, 比理论值 (40 kDa) 大 (图 3-A)。对照组采用多肽抗原进行 Western blotting, 证实了抗体特异性。牙鲈 *mPRL* 蛋白表达量在卵巢和脑中相对较高, 在头肾、肾脏和肝脏组织中也有表达, 但表达量相对较少 (图 3-B)。在卵巢、脑和肝脏等多个组织的表达说明, *mPRL* 在牙鲈多种组织中参与调节孕激素生理功能。

2.4 *mPRL* 蛋白的细胞学定位

免疫组化结果显示, 牙鲈 *mPRL* 在卵巢和脑的细胞学定位与 *mPRL* mRNA 一致。在性成熟卵巢组织中, *mPRL* 主要分布于卵母细胞膜上, 具有较强的免

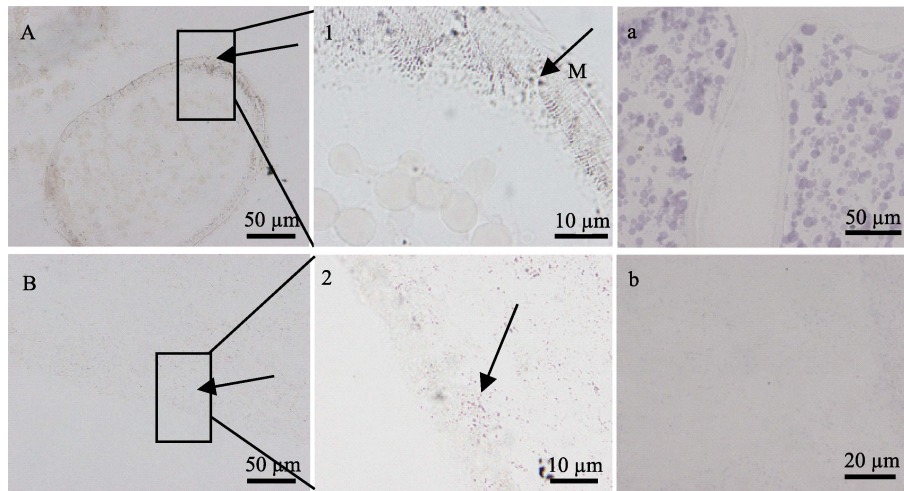
图 2 牙鲆 *mPRL* 基因在卵巢和脑组织中的细胞学定位

Fig.2 Localization of *mPRL* mRNA in ovary and brain tissues of *P. olivaceus* using *in situ* hybridization

A: 卵巢; 1: 卵巢($\times 1000$); a: 卵巢对照组; B: 脑; 2: 脑($\times 1000$); b: 脑对照组;
M: 卵母细胞膜; 箭头指向为阳性信号位置

A: Ovary; 1: Ovary ($\times 1000$); a: Negative control of ovary; B: Brain; 2: Brain ($\times 1000$); b: Negative control of brain;
M: Oocyte membrane; the arrows indicated the positive reaction

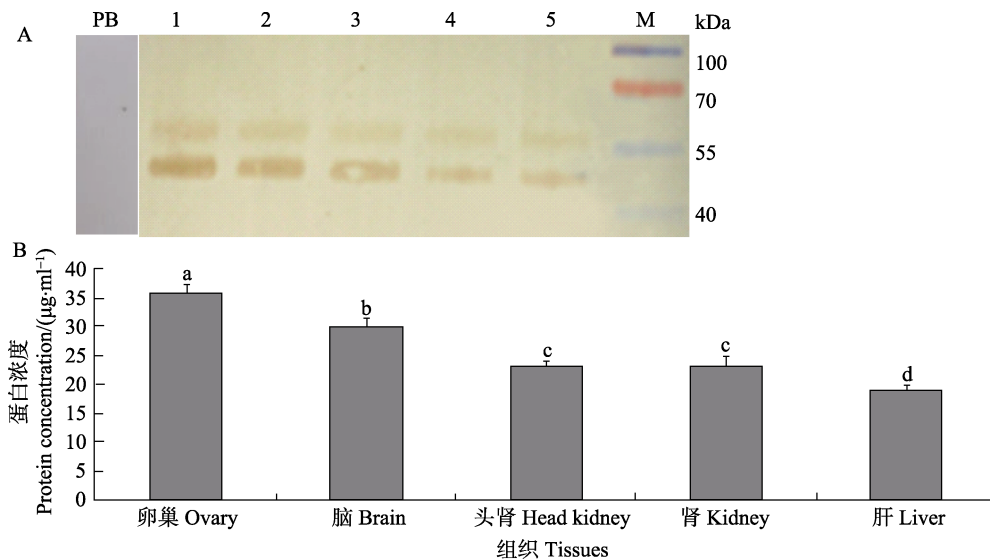


图 3 牙鲆各组织 mPRL 蛋白的表达

Fig.3 Expression of *mPRL* protein in different tissues of *P. olivaceus*

A: *mPRL* 蛋白表达电泳图; B: *mPRL* 蛋白表达量化; 1: 卵巢; 2: 脑; 3: 头肾; 4: 肾; 5: 肝;
M: 蛋白分子量标准; PB: 阴性对照

A: Electrophoregram of protein expression of *mPRL*; B: Quantitative abundance of *mPRL* protein expression;
1: Ovary; 2: Brain; 3: Head kidney; 4: Kidney; 5: Liver; M: Protein molecular weight marker; PB: Negative control

疫阳性显色(图 4-A); 放大 1000 倍后可以很明显看出其在膜附近的表达密集(图 4-1)。在脑组织中 *mPRL* 主要定位在脑组织的神经元附近(图 4-B), 放大 1000 倍后可以明显看到该区域免疫阳性反应特征(图 4-2)。图 4-a 和图 4-b 为相应组织免疫组化分析的阴性对照。

3 讨论

3.1 *mPRL* 在卵母细胞成熟过程中的表达分析

通过 qRT-PCR 方法分析了 *mPRL* 转录本在牙鲆不同组织中的表达, 发现 *mPRL* 在卵巢、脑、心、鳃

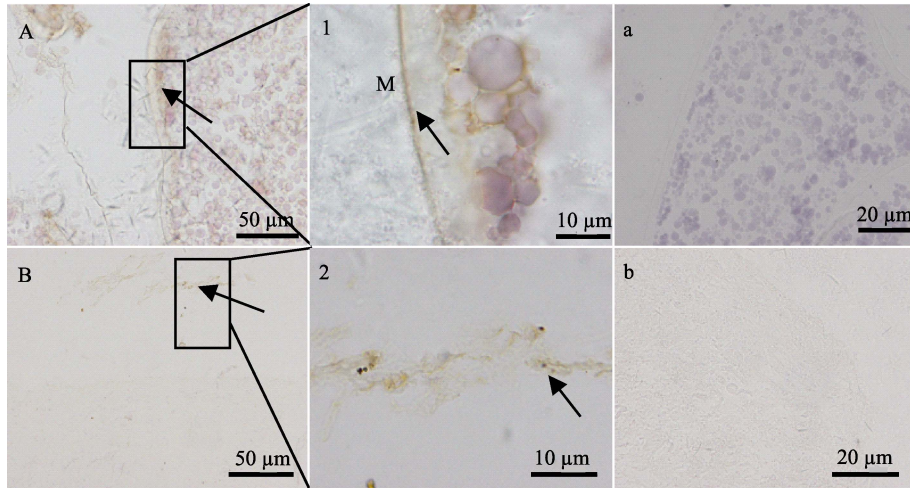


图 4 牙鲆 mPRL 蛋白在卵巢和脑组织的细胞定位

Fig.4 Localization of mPRL protein in the ovary and brain of *P. olivaceus* demonstrated by immunohistochemistry

A: 卵巢; 1: 卵巢($\times 1000$); a: 卵巢对照组; B: 脑; 2: 脑($\times 1000$); b: 脑对照组;
M: 卵母细胞膜; 箭头指向为阳性信号位置

A: Ovary; 1: Ovary ($\times 1000$); a: Negative control of ovary; B: Brain; 2: Brain ($\times 1000$); b: Negative control of brain;
M: Oocyte membrane; the arrows indicated the positive reaction

等组织表达丰富,在垂体、肝、肾脏、肌肉等器官相对表达量较低(李晓晓等,2013)。为进一步分析 *mPRL* 在牙鲆卵巢的作用机制,本研究通过 qRT-PCR 方法检测不同发育阶段卵母细胞母源的 *mPRL* 转录本。发现 *mPRL* mRNA 随着卵母细胞发育,表达水平逐步升高;在牙鲆发育 V 期的卵巢,处于 V 时相卵母细胞的 *mPRL* mRNA 表达量最高。当前,关于 PAQR 基因家族在配子发育早期的生理作用未见研究报道(Tokumoto *et al*, 2006; 柳学周等, 2015)。根据本研究结果,推测 *mPRL* 可能参与卵母细胞的卵黄发生。在卵黄生成后期卵母细胞和成熟阶段卵母细胞 *mPRL* mRNA 转录水平急剧上升,预示牙鲆 *mPRL* 基因参与调控卵母细胞成熟。

3.2 表达与定位分析

Western blotting 分析发现, *mPRL* 蛋白表达量在卵巢和脑中相对较高,在肝脏、肾脏、头肾中也有表达,但表达量相对较少。明显的蛋白免疫反应条带出现在约 50 kDa 位置,比理论预测的蛋白分子量(40 kDa)大 10 kDa。这种差异可能来自糖基化作用等蛋白质翻译后的修饰(Jiménez-Castaño *et al*, 2007),这

也是需要进一步研究证实的内容之一。在本研究中,牙鲆 *mPRL* 基因和蛋白在繁殖内分泌相关组织表达较为丰富,并且在 V 时相卵母细胞 *mPRL* mRNA 表达量和 V 期的卵巢组织 *mPRL* 蛋白表达量均最大,说明 *mPRL* 在卵巢具有重要的成熟调控功能。

采用原位杂交和免疫组化方法分析了牙鲆 *mPRL* 转录本和蛋白在繁殖相关器官的细胞学定位,结果显示, *mPRL* 基因和蛋白阳性信号特异性的定位在成熟性腺的卵母细胞膜上,并在脑组织的神经元细胞中分布; *mPRL* 在这些繁殖相关器官的分布表明,孕激素在牙鲆卵巢和脑可以通过 *mPRL* 介导的信号通路发挥作用。孕激素在神经系统具有重要的生理功能,如调节促性腺激素释放激素(GnRH)释放和繁殖行为等(Petersen *et al*, 2013)。 *mPRL* 在牙鲆脑的分布预示 *mPRL* 介导孕激素参与神经内分泌功能调节,进而影响牙鲆繁殖。研究发现,在牙鲆繁殖周期性腺发育的不同阶段, *mPRL* mRNA 在脑-垂体-性腺轴相对表达水平显著升高并在 V 期达到峰值($P < 0.05$),在 VI 期表达量下降;另外,牙鲆血清中孕激素含量变化也随着性腺的发育呈先升高后降低的变化特征(史宝, 2010¹⁾; 李晓晓, 2013²⁾)。因此, *mPRL* 在牙鲆卵巢发育的过

1) Shi B. Study on the molecular mechanisms of reproductive endocrinology in *Paralichthys olivaceus* and *Paralichthys lethostigma*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2010, 1-176 [史宝. 牙鲆繁殖内分泌分子机理研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010, 1-176]

2) Li XX. Study on the physiological function of membrane progesterin receptor in the reproductive cycle of flatfish. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013, 1-73 [李晓晓. 膜孕激素受体在鲆鲽类繁殖周期中的生理功能研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 1-73]

程表达增强,结合本研究中 mPRL 在成熟卵母细胞膜上的定位,预示 mPRL 是受孕激素调控的介导卵母细胞成熟的膜受体。相关的研究也发现与本研究相似的结果,通过原位杂交和免疫组化的方法发现斑马鱼(*Danio rerio*)的 mPR α 定位在卵母细胞膜附近或者卵母细胞膜上,结合云纹犬牙石首鱼(*Cynoscion nebulosus*)过表达 mPR α 可以加速卵母细胞成熟,表明 mPR α 参与卵母细胞成熟调控(Hanna *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2007)。牙鲆 mPRL 与其他鱼类的 mPR α 在卵母细胞膜上类似的表达模式表明,它们可能在卵巢具有相似的生理功能。

mPRL 基因属于膜孕激素受体家族的一员,为本团队近年来在鲆鲽类发现的一种介导卵母细胞成熟的功能基因(柳学周等, 2015),并发现在半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)和大黄鱼(*Larimichthys crocea*)等鱼类的基因组中存在该基因的同源序列;有关 mPRL 基因与膜孕激素受体成员 mPR(α 、 β 、 γ)在介导卵母细胞成熟、神经内分泌调控和繁殖行为等方面是如何协调配比调控孕激素发挥生理学作用以及是否激活相同的信号通路发挥生理功能的研究未见报道;鉴于 mPRL 基因在鲆鲽类卵母细胞成熟过程中的重要作用,今后将通过真核表达方式获得重组蛋白,进一步分析其蛋白结构、家族各成员之间的作用并将产生的蛋白应用于亲鱼的促熟实验,以利于获得足够数量的和高质量具有受精能力的鱼卵,这不仅对具有经济价值的鱼类产业发展有极大的促进作用,而且可将该技术应用于濒危鱼类繁衍后代。

参 考 文 献

- Fernandes MS, Pierron V, Michalovich D, *et al.* Regulated expression of putative membrane progestin receptor homologues in human endometrium and gestational tissues. *Journal of Endocrinology*, 2005, 187(1): 89–101
- Hanna RN, Zhu Y. Expression of membrane progestin receptors in zebrafish (*Danio rerio*) oocytes, testis and pituitary. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 161(1): 153–157
- Hasegawa J, Yanaihara A, Iwasaki S, *et al.* Reduction of progesterone receptor expression in human cumulus cells at the time of oocyte collection during IVF is associated with good embryo quality. *Human Reproduction*, 2005, 20(8): 2194–2200
- Jiménez-Castaño L, Villamiel M, López-Fandiño R. Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass. *Food Hydrocolloids*, 2007, 21(3): 433–443
- Josefsberg Ben-Yehoshua L, Lewellyn AL, Thomas P, *et al.* The role of *Xenopus* membrane progesterone receptor β in mediating the effect of progesterone on oocyte maturation. *Molecular Endocrinology*, 2007, 21(3): 664–673
- Karteris E, Zervou S, Pang Y, *et al.* Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein coupled receptors: Potential role in functional progesterone withdrawal at term. *Molecular Endocrinology*, 2006, 20(7): 1519–1534
- Liu XZ, Shi B, Li XX, *et al.* Molecular characterization of the novel membrane progestin receptor gene and its role during ovarian development in the half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(4): 608–619 [柳学周, 史宝, 李晓晓, 等. 半滑舌鳎新型膜孕激素受体基因分子特征及其在卵巢发育过程的作用. *中国水产科学*, 2015, 22(4): 608–619]
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- Mulac-Jericevic B, Conneely OM. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction*, 2004, 128(2): 139–146
- Nagahama Y, Yamashita M. Regulation of oocyte maturation in fish. *Development, Growth and Differentiation*, 2008, 50(S1): 195–219
- Petersen SL, Intlekofer KA, Moura-Conlon PJ, *et al.* Novel progesterone receptors: Neural localization and possible functions. *Frontiers in Neuroscience*, 2013, 7: 1–7
- Shi B, Li XX, Liu XZ, *et al.* Molecular cloning and tissue expression analysis of membrane progestin receptor alpha gene (mPR α) from half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(3): 61–67 [史宝, 李晓晓, 柳学周, 等. 半滑舌鳎膜孕激素受体基因克隆与组织表达分析. *渔业科学进展*, 2013, 34(3): 61–67]
- Tang YT, Hu T, Arterburn M, *et al.* PAQR proteins: Novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif. *Journal of Molecular Evolution*, 2005, 61(3): 372–380
- Thomas P, Pang Y, Dong J. *et al.* Steroid and G protein binding characteristics of the seatrout and human progestin membrane receptor alpha subtypes and their evolutionary origins. *Endocrinology*, 2007, 148(2): 705–718
- Tokumoto M, Nagahama Y, Thomas P, *et al.* Cloning and identification of a membrane progestin receptor in goldfish ovaries and evidence it is an intermediary in oocyte meiotic maturation. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 145(1): 101–108
- Zhu Y, Hanna R, Schaaf M, *et al.* Candidates for membrane progestin receptors—past approaches and future challenges. *Comparative Biochemistry Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2008, 148(4): 381–389

Expression Characterization of the Novel Membrane Progesterin Receptor (mPR-Like) in Sexual Maturation of Female Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)

SHI Bao^{1,2}, LIU Xuezhou^{1,2①}, XU Tao³, LI Xiaoni^{1,2}, XU Yongjiang^{1,2}, ZHANG Jinyong^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. Shandong Province Fisheries Technology Extension Station, Jinan 250013)

Abstract This research examined the expression characteristics and mechanism of the novel membrane progesterin receptor-like (mPRL) in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. In the present study, the temporal changes of *mPRL* mRNA expression level in isolated oocytes at various oogenesis stages were measured using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The *mPRL* transcript levels significantly increased with the oocyte development, with the peak level at stage V. However, the transcript level decreased significantly at stage VI. These expression characteristics of *mPRL* showed that *mPRL* is a good marker for studying the oocyte maturation. The spatial expression of *P. olivaceus mPRL* mRNA in the ovary and brain was demonstrated using *in situ* hybridization. Results revealed that *mPRL* transcript was localized at the membrane of oocytes, and the positive signals were also observed in the brain neurons of *P. olivaceus*. Specifically, high-titer rabbit polyclonal antibody was generated against synthetic peptides derived from the C-terminal domain of *P. olivaceus mPRL* amino acid. Immunoblotting analysis identified the immunoactive protein that bands in the ovary, brain, head kidney, kidney and liver of *P. olivaceus*. However, the expression levels of protein in ovary and brain were higher than other tissues. The protein was localized in the major reproductive associated organs including the ovary and brain using immunohistochemistry. Moreover, the cellular localization of mPRL protein was similar with that of mRNA in *P. olivaceus*. The intensive signals were observed at the edge of pituitary and brain, and the intensity of positive signals was found on the membrane of oocytes. This is to date the first study that examined the tissue specific localization of mPRL protein and transcript in the reproductive organs of *P. olivaceus*. The mPRL expression characteristics implied that mPRL regulates the reproduction of *P. olivaceus* through the endocrine system. Furthermore, the evidence supports a functional role of mPRL in the oocyte maturation of *P. olivaceus*, possibly, by acting as a mediator of progesterone.

Key words *Paralichthys olivaceus*; mPR-Like; mRNA expression; Protein expression

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

膜孕激素受体(mPR α)在半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)卵母细胞成熟过程中的表达特征*

李晓妮^{1,3} 柳学周^{1,2,3①} 史宝^{1,2} 徐永江^{1,2} 张金勇^{1,3}



(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物
产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 大连海洋大学 大连 110623)

摘要 通过实时荧光定量 PCR 方法(qRT-PCR)检测半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)雌性性成熟不同时期、不同时相卵母细胞中膜孕激素受体(mPR α)的表达,通过 qRT-PCR 和 Western blotting 方法检测促性腺激素(HCG)对成熟期半滑舌鲷卵母细胞 mPR α 表达的影响,同时,采用原位杂交、免疫组化和 Western blotting 方法研究雌性性成熟半滑舌鲷 mPR α mRNA 和蛋白在各组织中的表达。对半滑舌鲷性成熟不同时期、不同时相卵母细胞中 mPR α mRNA 的定量研究结果显示,在成熟时期半滑舌鲷 V 时相卵母细胞的 mPR α mRNA 表达量最高。HCG 对成熟期半滑舌鲷卵母细胞 mPR α 表达的影响研究结果显示,20 IU/ml HCG 比 10 IU/ml HCG 对成熟时期半滑舌鲷卵母细胞 mPR α mRNA 和蛋白表达的促进作用更明显,进一步证明 mPR α 介导孕激素参与了卵母细胞成熟的调控。对 mPR α 组织表达的定量和定位研究中,Western blotting 结果显示,在半滑舌鲷的卵巢、垂体、脑、头肾、肾、肝脏组织中均有 mPR α 蛋白表达,且在脑、垂体和卵巢中表达量较高,表明 mPR α 在不同组织中都发挥着一定的作用,且在内分泌相关组织如脑、垂体和卵巢中的作用更明显。原位杂交和免疫组化结果显示, mPR α mRNA 和蛋白表达明显定位在卵母细胞膜上,且在其他组织的外周和管腔结构表达。本研究为进一步研究 mPR α 在膜上的信号转导机制提供了理论基础和形态学依据。

关键词 膜孕激素受体;半滑舌鲷;原位杂交;免疫组化;Western blotting;实时荧光定量 PCR
中图分类号 S961 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0025-09

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)是我国重要的海水养殖经济鱼类(柳学周等, 2005),其养殖产业是我国北方海水养殖业的重要组成部分,在一定程度上代表了我国水产养殖业,尤其是海水养殖业的发展方向(杨正勇等, 2009)。近年来,半滑舌鲷生殖调控及规模化人工繁育技术的研究获得重大突破(柳学周等, 2006),但在生产实践中,时常出现亲鱼产卵质量差等现象,影响了苗种生产(史宝等, 2013)。因此,研

究其生殖内分泌调控等方面的机理显得尤为重要。

膜孕激素受体(mPR)介导孕激素在细胞膜上发挥生理学功能,如参与鱼类卵母细胞的成熟(Hanna *et al*, 2009; Mourot *et al*, 2006; Tokumoto *et al*, 2006; Tubbs *et al*, 2010)。在鱼类生殖相关组织如卵巢和脑等检测到 mPRs 蛋白的表达,表明它们在卵巢和脑中介导孕激素行使不同的作用(Hanna *et al*, 2009)。mPR α 作为 mPRs 家族的重要受体基因,在其中扮演着重要的角

*国家自然科学基金项目(31201982)、国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50)和山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2013SW042)共同资助 [This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31201982), China Agriculture Research System (CARS-50), and Shandong Youth Scientist Awards Foundation (BS2013SW042)]
李晓妮, E-mail: 857903563@qq.com

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-12-14, 收修改稿日期: 2016-01-25

色, 研究其表达对了解整个 mPR 家族的功能具有重要意义。目前, *mPR α* 在人类(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)等动物研究中有很多新进展(Frye *et al.*, 2014; Thomas *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2015), 近几年在斑马鱼(*Danio rerio*) (Thomas, 2012)、金鱼(*Carassius auratus*) (Kazeto *et al.*, 2005a、b; Oshima *et al.*, 2014)、漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*) (Tan *et al.*, 2014a)和大西洋绒须石首鱼(*Micropogonias undulatus*) (Tan *et al.*, 2014b)几种硬骨鱼类中有研究。但在重要海水经济鱼类半滑舌鲷中的研究鲜有报道, 史宝等(2013)研究了 *mPR α* 基因在性成熟半滑舌鲷各组织中的表达分布, 但有关 *mPR α* 的空间定位表达及生理功能研究仍相对较少, 相关研究工作亟待开展。

本研究通过实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)、原位杂交、Western blotting 和免疫组化等方法从基因和蛋白水平对 *mPR α* 在半滑舌鲷不同发育阶段卵母细胞和组织中的表达进行了定量和定位研究, 为 *mPR α* 在半滑舌鲷卵母细胞成熟过程中的生理功能提供重要参考资料, 并为鱼类繁殖内分泌调控研究提供科学依据, 同时为多产优产的目标提供解决思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用半滑舌鲷取自山东青岛忠海水产有限公司。雌性半滑舌鲷亲鱼全长为 53–66 cm, 体重为 1266.3–2271.0 g。实验所用的亲鱼为人工培育养殖达到性成熟的 3 龄全人工亲鱼。不同繁殖期在相同亲鱼培育池中随机选取 4 条半滑舌鲷雌鱼, 分别对不同繁殖期鱼的卵巢取样, 连续采集 1 年。解剖前先用 MS-222(Sigma 公司)麻醉亲鱼, 部分卵巢组织取出后放于 Davidson's AFA 中固定, 显微镜下按不同发育时相直径将卵巢组织的卵母细胞分类(柳学周等, 2015), 使用液氮速冻后保存在 -80°C , 一部分样品用于提取 RNA, 另一部分样品用于提取蛋白。在半滑舌鲷繁殖季节, 挑选腹部有明显膨大隆起且柔软的雌鱼, 取各组织样, 将其分为 3 部分, 在 4°C 条件下使用 4%多聚甲醛固定 20 h, 梯度甲醇脱水, 在 -20°C 条件下保存于甲醇中, 一部分用于免疫组化, 一部分样品用于原位杂交; 使用液氮速冻后保存在 -80°C 的样品, 用于总 RNA 和总蛋白的提取。在显微镜下按不同发育时相将卵巢组织的卵母细胞分类, 一部分样品用于促性腺激素(HCG)处理并培养, 另一部分不处理作为对照, 处理完的卵母细胞放于 -80°C 保存, 用于之后的

总 RNA 和总蛋白的提取。

1.2 总 RNA 提取、cDNA 的合成和 qRT-PCR

半滑舌鲷不同发育阶段卵母细胞取自不同性腺发育期, 卵巢分期参考柳学周等(2009)。每个卵母细胞发育时相设 4 个重复, 从不同发育时期的半滑舌鲷中分别挑取 II、III、IV、V 和 VI 时相卵母细胞, 提取总 RNA 进行反转录并参照 TaKaRa 生物公司的 PrimerScriptTM RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒合成 cDNA 第一链, 用于基因表达分析。ST-mPR α F 引物序列: 5'-CTCCATCTATCGGCTTCA AACAA-3'; ST-mPR α R: 5'-ACCAATCTGCTCCATCA CCAC-3', 引物由 TaKaRa 生物公司合成。qRT-PCR 反应体系为 20 μl : 1 μl cDNA 模板, 0.5 μl 引物(10 $\mu\text{mol/L}$), 10 μl SYBR Premix Ex TaqTM II 和 8 μl ddH₂O。采用两步法 PCR 扩增程序, 反应条件为 95°C 预变性 30 s, 95°C 5 s、 60°C 20 s, 共 40 个循环。使用 18S rRNA 基因作为内参对照, 用以校正所有样品中 RNA 的量。qRT-PCR 反应及信息收集均在 Mastercycler ep realplex 实时荧光定量 PCR 仪(Eppendorf 公司)上进行。程序运行完成后, 进行熔解曲线分析, 以确定引物及反应是否正常。每个样品设置 3 个平行, 重复 3 次实验, 同时设阴性对照, 以确认实验结果的可靠性。

1.3 *mPR α* 原位杂交质粒构建、探针合成与纯化

根据半滑舌鲷 *mPR α* cDNA 序列设计和合成引物。上游: 5'-AAGCTTCAGCCTTCACCTACCTCTCC T-3'; 下游: 5'-GAATTCGCAGGCAGTGAAGATGAA CAG-3'。PCR 预期扩增产物为 650 bp, 1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。分别用限制性内切酶 *Hind* III 和 *EcoR* I (均购自 NEB 公司)对回收的 PCR 产物和载体 pBST-18 进行双酶切, 1%琼脂糖凝胶电泳检测后, 试剂盒回收。然后通过 T4 快速连接酶(购自 NEB 公司)进行连接, 将 PCR 产物克隆到 pBST-18 载体中。再将连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞(全式金), 挑取 PCR 检测阳性克隆, 扩增培养, 少量提取质粒, 用 *Hind* III 和 *EcoR* I 进行双酶切鉴定, 然后测序验证。将扩增后的阳性菌落提取的质粒分别用限制性内切酶 *Hind* III 和 *EcoR* I 酶切, 使其完全线性化, 1%琼脂糖电泳检测并回收。回收的酶切片段即为合成正、反义 RNA 探针的模板。按 Roche 公司的 DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)试剂盒说明书, 分别用 SP6、T7 转录酶进行体外转录, 参照产品说明书合成地高辛标记的正、反义 RNA 探针。合成的 RNA 探针用 1%琼脂糖电泳和紫外分光光度计鉴定检测。

1.4 mPRA mRNA 在成熟雌鱼组织中的定位

采用 Roche 公司的 DIG Wash and Block Buffer Set、Blocking Reagent 和 NBT/BCIP Stock Solution 试剂盒进行。详细操作参照产品说明书。

二甲苯脱蜡处理 3 次, 每次 5 min; 无水乙醇处理 2 次, 每次 10 min; 95%、70%和 50%乙醇逐级脱水, 各处理 5 min。4% PFA-PBS 固定 10 min。PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min。0.2 mol/L 的 HCl 处理 10 min。PBST 冲洗 2 次, 每次 10 min。10 μ g/ml 蛋白酶 K(默克公司)消化 10 min。PBST 冲洗 3 次, 每次 5 min。加入含 tRNA 和肝素预杂交液, 70 $^{\circ}$ C 预杂交 8 h, 再加入反义 RNA 探针 200 ng 的杂交液, 70 $^{\circ}$ C 过夜。50% 无 tRNA 和肝素的预杂交液和 50% 2 \times SSC, 70 $^{\circ}$ C, 15 min, 0.2 \times SSC, 70 $^{\circ}$ C, 1 h。1 \times MAB 室温 5 min。含 10% 山羊血清(博奥森公司)的封闭液室温封闭, 6 h。1:500 封闭液稀释的抗体, 4 $^{\circ}$ C 过夜。PBST 室温冲洗 6 次, 每次 15 min; 碱性磷酸缓冲液室温冲洗 2 次, 每次 10 min。加 200 μ l BCIP/NBT 底物溶液, 置黑暗处显色, 观察颜色变化。待显色达到理想着色后, PBST 洗涤 5 次(每次 5 min)终止反应, 4% PFA-PBS 固定 10 min, PBST 洗 3 次(每次 5 min); 酒精梯度脱水、二甲苯透明, 封片, 拍照。

1.5 成熟雌鱼组织中 mPRA 蛋白定量分析

取冻存的各组织(约 100 mg), 加入 1 ml 动物组织蛋白提取试剂, 使用 Pro 精密手持匀浆器充分匀浆, 冰浴中静置 30 min, 于 4 $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 即得到组织蛋白提取液。12% SDS-PAGE 电泳检测提取蛋白的质量, 并使用蛋白测定试剂盒(Thermo Scientific 公司)测定组织总蛋白浓度。分析半滑舌鲷 mPRA 蛋白序列选择抗原表位, 并合成相应的免疫多肽; 将合成的多肽常规免疫新西兰大白兔, 制备抗体。使用此多克隆抗体进行 Western blotting, 检测蛋白的表达水平。

12% SDS-PAGE 蛋白电泳, 每孔上样量约 80 μ g, 220 V 25 min。转膜: 缓冲液泡凝胶 15 min, 将滤纸在缓冲液中浸泡 15 min; PVDF 膜甲醇中浸泡 1 min, 缓冲液中浸泡 15 min, 活化 PVDF 膜; 按阳极-滤纸-PVDF 膜-凝胶-滤纸-阴极的顺序放入半干式转膜仪, 400 mA 25 min。洗涤取出 PVDF 膜, 1 \times PBST 洗涤; 5% 脱脂奶粉溶液封闭(1 \times PBST 稀释)室温 3 h; 洗涤; 加溶解一抗与 3% BSA(1:2000)摇床, 室温 2 h; 洗涤; 二抗(羊抗兔 IgG 抗体)(1 \times PBST 1:2000 稀释)[生工生物工程(上海)股份有限公司]摇床, 室温 2 h; 洗涤; DAB 显色拍照, 分析灰度。

1.6 mPRA 蛋白在成熟雌鱼组织中的表达定位

将保存在 100% 甲醇中的样品取出, 使用无水乙醇处理 2 次(每次 10 min); 二甲苯透明, 石蜡包埋, 7 μ m 厚度石蜡切片, 37 $^{\circ}$ C 烘干。具体免疫组化切片处理过程和条件如下(阴性对照: 1 \times PBS 代替一抗, 其余步骤同下): 二甲苯脱蜡 2 次, 每次 5 min; 梯度乙醇复水各 3 min; 1 \times PBST 洗涤; 3% H₂O₂(溶于甲醇中)室温孵育 15 min, 封闭内源酶; 洗涤; 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液微波炉加热沸腾后, 中低档保持 95 $^{\circ}$ C 20 min, 自然冷却至室温修复抗原; 洗涤; 3% BSA 封闭(溶于 1 \times PBST), 摇床上室温振摇 2 h。抗 mPRA 抗体(1:1000)稀释, 溶于 3% BSA, 滴加到载玻片上, 使其完全覆盖组织切片, 湿盒中室温过夜; 洗涤。二抗, 即羊抗兔 IgG 抗体(1:1000 稀释在 1 \times PBST 中)滴加到载玻片上, 湿盒中室温 1 h; 洗涤; DAB 显色; 洗涤; 苏木精染液复染 3-5 min; 0.1% HCl 分化复蓝后, 立即自来水冲洗; 梯度乙醇脱水; 二甲苯透明 2 min; 封片; 拍照。

1.7 HCG 调控卵母细胞 mPRA mRNA 和蛋白的表达

从半滑舌鲷不同发育阶段的卵巢分离出不同发育时相、未受损的卵母细胞。24 孔细胞培养板上每个孔放入 pH 为 7.6 的 2 ml 培养液(SIGMA, 美国), 培养液添加 HCG 溶液(SIGMA, 美国), 使其终浓度为 10 IU/ml 或 20 IU/ml, 同时, 每个激素添加实验组相应设置 1 个空白对照组。卵母细胞经 22 $^{\circ}$ C、6 h 培养后, 使用移液器将培养液移出, 收集卵母细胞, 迅速放入液氮中冻存, 用于 mRNA 和蛋白表达分析; 每个样品设置 3 个平行, 重复 3 次实验。

1.8 统计分析

基因表达实验所得数据用相对定量的 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法(Livak *et al*, 2001)计算后, 使用 SPSS 17.0 软件的单因素方差分析(One-way ANOVA)(Tukey's HSD 检验)进行数据处理。 $P < 0.05$ 为差异显著。相对表达量数据均表示为平均数 \pm 标准误(Mean \pm SE)。蛋白表达水平检测采用 AIC.AlphaView 成像分析系统(Cell Biosciences Inc)分析灰度值。

2 结果

2.1 半滑舌鲷不同发育期的卵母细胞不同时相 mPRA mRNA 相对表达量比较

在性腺发育 II 期, 处于 II 时相的卵母细胞中 mPRA mRNA 的表达量最高; 在性腺发育 III、IV 期,

mPRA mRNA 表达量最高值分别出现在III、IV时相的卵母细胞中；性腺发育V期鱼的卵母细胞中，*mPRA* mRNA 表达量最高值出现在V时相卵母细胞 ($P<0.05$)。卵母细胞 *mPRA* mRNA 表达的最高值出现在性腺发育V期 ($P<0.05$)。*mPRA* mRNA 在性成熟半滑舌鲷的V时相卵母细胞的作用效果最强(图1)。

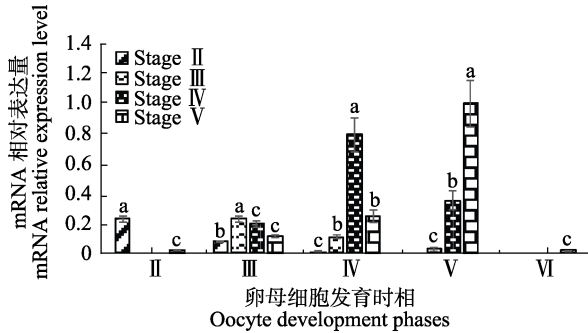


图1 不同发育时期半滑舌鲷卵母细胞不同时期 *mPRA* mRNA 的相对表达

Fig.1 The relative expression of *mPRA* mRNA at different oocyte phases in different development stage of *C. semilaevis*

不同字母间差异显著 ($P<0.05$), 下同

Different letters represent significant difference ($P<0.05$), the same as below

2.2 不同浓度 HCG 调控不同发育时期卵母细胞 *mPRA* mRNA 和蛋白表达

利用 qRT-PCR、Western blotting 技术, 检测不同浓度 HCG 处理下半滑舌鲷卵母细胞 *mPRA* mRNA 和蛋白表达情况。结果显示, 用 20 IU/ml 和 10 IU/ml HCG 处理的不同时期卵母细胞中 *mPRA* mRNA(图2)和蛋白(图3)的表达量都有所提高。20 IU/ml HCG 培养的细胞中 *mPRA* mRNA 和蛋白表达量远高于 10 IU/ml HCG 培养的卵母细胞中 *mPRA* mRNA 和蛋白的表达量。蛋白表达结果显示, 20 IU/ml HCG 对成熟时期半滑舌鲷V时相卵母细胞调控作用最明显。

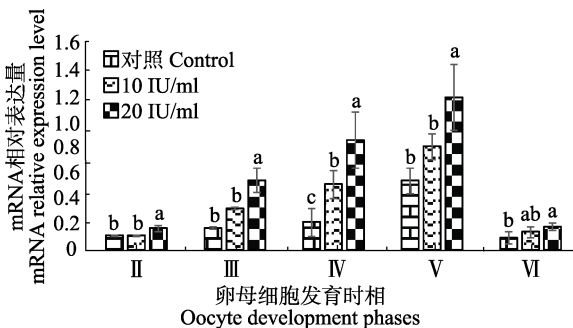


图2 不同浓度 HCG 调控半滑舌鲷不同发育阶段卵母细胞 *mPRA* mRNA 的表达

Fig.2 Effects of HCG at different concentrations on *mPRA* mRNA expression in different oocyte phases of *C. semilaevis*

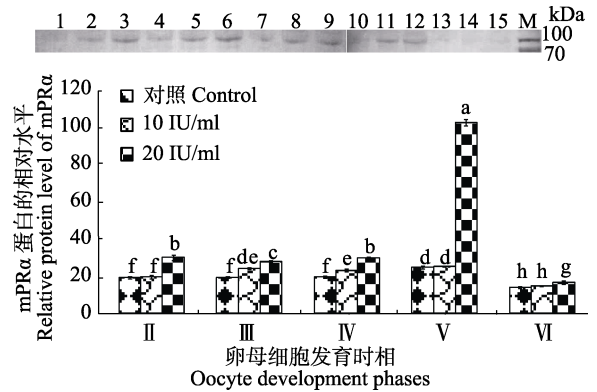


图3 不同浓度 HCG 对不同时期卵母细胞 *mPRA* 蛋白表达量的影响

Fig.3 Effects of HCG at different concentrations on *mPRA* protein expression in different oocyte phases of *C. semilaevis*

1: 对照组, II期卵母细胞; 2: 10 IU/ml HCG, II期卵母细胞; 3: 20 IU/ml HCG, II期卵母细胞; 4: 对照组, III期卵母细胞; 5: 10 IU/ml HCG, III期卵母细胞; 6: 20 IU/ml HCG, III期卵母细胞; 7: 对照组, IV期卵母细胞; 8: 10 IU/ml HCG, IV期卵母细胞; 9: 20 IU/ml HCG, IV期卵母细胞; 10: 对照组, V期卵母细胞; 11: 10 IU/ml HCG, V期卵母细胞; 12: 20 IU/ml HCG, V期卵母细胞; 13: 对照组, VI期; 14: 10 IU/ml HCG, VI期卵母细胞; 15: 20 IU/ml HCG, VI期卵母细胞; M: 分子量标准

1: Control group, stage II oocytes; 2: 10 IU/ml HCG, stage II oocytes; 3: 20 IU/ml HCG, stage II oocytes; 4: Control group, stage III oocytes; 5: 10 IU/ml HCG, stage III oocytes; 6: 20 IU/ml HCG, stage III oocytes; 7: Control group, stage IV oocytes; 8: 10 IU/ml HCG, stage IV oocytes; 9: 20 IU/ml HCG, stage IV oocytes; 10: Control group, stage V oocytes; 11: 10 IU/ml HCG, stage V oocytes; 12: 20 IU/ml HCG, stage V oocytes; 13: Control group, stage VI oocytes; 14: 10 IU/ml HCG, stage VI oocytes; 15: 20 IU/ml HCG, stage VI oocytes; M: Marker

2.3 *mPRA* mRNA 和蛋白在不同组织中的表达

对不同组织中 *mPRA* 总蛋白表达量进行 Western blotting 检测, 结果见图4, *mPRA* 蛋白表达量在脑、卵巢中相对较高, 其他组织中也有表达, 表达量相对较少(图4)。

用所标记的正反义探针分别与半滑舌鲷卵巢、肝脏、头肾、肾脏、脑等组织中 mRNA 进行原位杂交反应, 如图5所示, 作为阳性对照的 A、B、C、D、E、F、G 反义探针显示阳性结果, 作为阴性对照的图 a、b、c、d、e、f 的正义探针没有杂交显色信号。用多克隆抗体分别与半滑舌鲷卵巢、肝脏、头肾、肾脏、脑、垂体组织蛋白进行免疫反应, 如图6所示, 一抗孵育的 A、B、C、D、E、F 显示免疫显色结果, 用 $1\times$ PBS

代替一抗孵育作为阴性对照的 a、b、c、d、e、f 没有免疫显色信号。

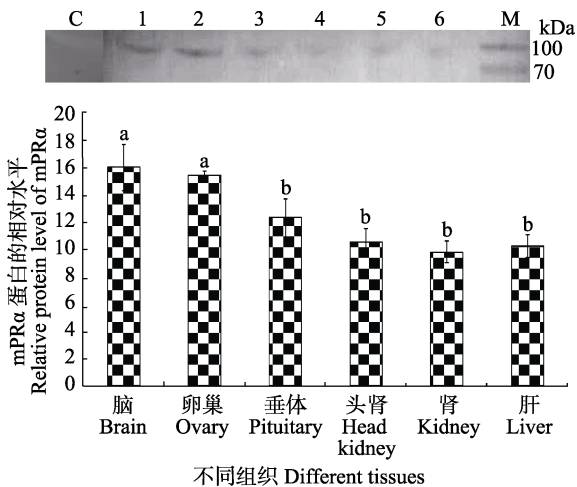


图 4 各组织 mPR α 蛋白表达量

Fig.4 Expression level of mPR α protein in different tissues

1: 脑; 2: 卵巢; 3: 垂体; 4: 头肾; 5: 肾; 6: 肝;

M: 分子量标准; C: 对照

1: Brain; 2: Ovary; 3: Pituitary; 4: Head-kidney; 5: Kidney;
6: Liver; M: Marker; C: Control

图 5-A 和图 6-A 显示, 在成熟卵巢组织中, mPR α mRNA 和蛋白在卵母细胞膜上显著性表达。图 5-B、图 6-B 和图 6-D 显示, 相比内部头、肾、脑的表达部位, mPR α mRNA 和蛋白在组织外周的显色表达更明显。图 5-C 和图 6-C 显示, mPR α mRNA 和蛋白主要在肝脏的胆总管或肝静脉周围显色。图 5-E 和图 6-E 显示, mPR α mRNA 和蛋白主要在肾脏的外周部位和肾小管表达, 放大 1000 倍可以很明显地看出其在外周部位以及肾小管的管腔内外的表达。图 5-F、图 5-G 和图 6-F 显示, mPR α mRNA 和蛋白主要在垂体外周组织表达。

3 讨论

3.1 mPR α 在卵母细胞成熟过程中的表达及激素调控后的表达分析

孕激素作为一种甾体激素, 参与调控生物体内的多种生理过程, 在动物生殖活动中起着非常重要的作用(Arck *et al*, 2007)。当孕激素与其受体结合后, 激活成熟促进因子, 卵母细胞完成减数分裂成熟(Masui *et al*, 1971; Nagahama, 1987)。Pace 等(2005)研究表明, 孕激素可通过 mPRs 诱导卵母细胞成熟。Tokumoto

等(2006)检测到 mPR α mRNA 在成熟金鱼卵母细胞各个发育阶段均表达。本研究分析 mPR α 作用精确到半滑舌鲷卵巢不同发育时期的不同时相卵母细胞。通过实时荧光定量技术分析, 显示在半滑舌鲷不同发育时期的性成熟卵巢的卵母细胞也都有 mPR α mRNA 的表达, 表明 mPR α 在不同时相卵母细胞都发挥着一定的生理作用; 并且卵母细胞 mPR α mRNA 表达的最高值出现在 V 期卵巢的第 V 时相卵母细胞中。李晓晓(2013)¹⁾研究发现, 在半滑舌鲷性成熟繁殖周期, 卵巢 mPR α mRNA 表达量最大值出现在 V 期卵巢, 本研究从细胞水平进一步验证了 V 期半滑舌鲷第 V 时相 mPR α mRNA 表达量最高。RNA 原位杂交、免疫组化结果显示, mPR α mRNA 和蛋白都在卵巢成熟期的卵母细胞膜上显著表达, 且 Western blotting 结果显示, 其蛋白表达量丰富, 此阶段 mPR α mRNA 高表达量进一步证明, mPR α 在介导孕激素、促进卵母细胞成熟的生理功能上发挥重要的作用。相关报道发现与本研究相似的结果: 斑马鱼、金鱼和斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)中, mPR α 均参与诱导卵母细胞成熟(Kazeto *et al*, 2005a、b; Tokumoto *et al*, 2012 a、b)。

鱼类的卵母细胞生长完成后, 促黄体激素刺激卵巢滤泡产生成熟诱导类固醇激素, 然后成熟诱导类固醇激素通过 mPR α 诱导卵母细胞成熟(Nagahama *et al*, 2008)。本研究采用促性腺激素诱导半滑舌鲷卵母细胞成熟后, 发现不同时相卵母细胞中 mPR α mRNA 和蛋白的表达都明显上调。在 HCG 激素调控作用下, mPR α 的正向应答效应进一步证明 mPR α 介导孕激素参与了卵母细胞成熟调控过程。20 IU/ml HCG 对 mPR α mRNA 和蛋白表达的调控作用比 10 IU/ml HCG 作用更明显, 表明 mPR α mRNA 和蛋白表达对 HCG 调控作用存在剂量依存关系。赵维信等(1986)也发现了类似结果, 大西洋鲑(*Salmo salar*)的卵母细胞在促性腺激素刺激下, 可连续地释放孕激素(17 α , 20 β -DHP), 此时卵母细胞的胚泡破裂达到最后成熟, 同时, 该研究也说明孕激素是一种高效催熟剂。

3.2 mPR α 组织表达与定位分析

史宝等(2013)研究发现, mPR α mRNA 较丰富地表达于半滑舌鲷卵巢、垂体、脑、头肾、肾组织, 而在肝组织中表达较弱。本研究用 Western blotting 方法检测半滑舌鲷 mPR α 蛋白的表达, 结果显示, mPR α 蛋白在卵巢、脑、垂体中表达量较高, 在肝、肾、头肾组织中也有表达, 与 mPR α mRNA 结果基本一致。

1) Li XX. Study on the physiological function of membrane progesterin receptor in the reproductive cycle of flatfish. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013 [李晓晓. 膜孕激素受体在鲆鲽类繁殖周期中的生理功能研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013]

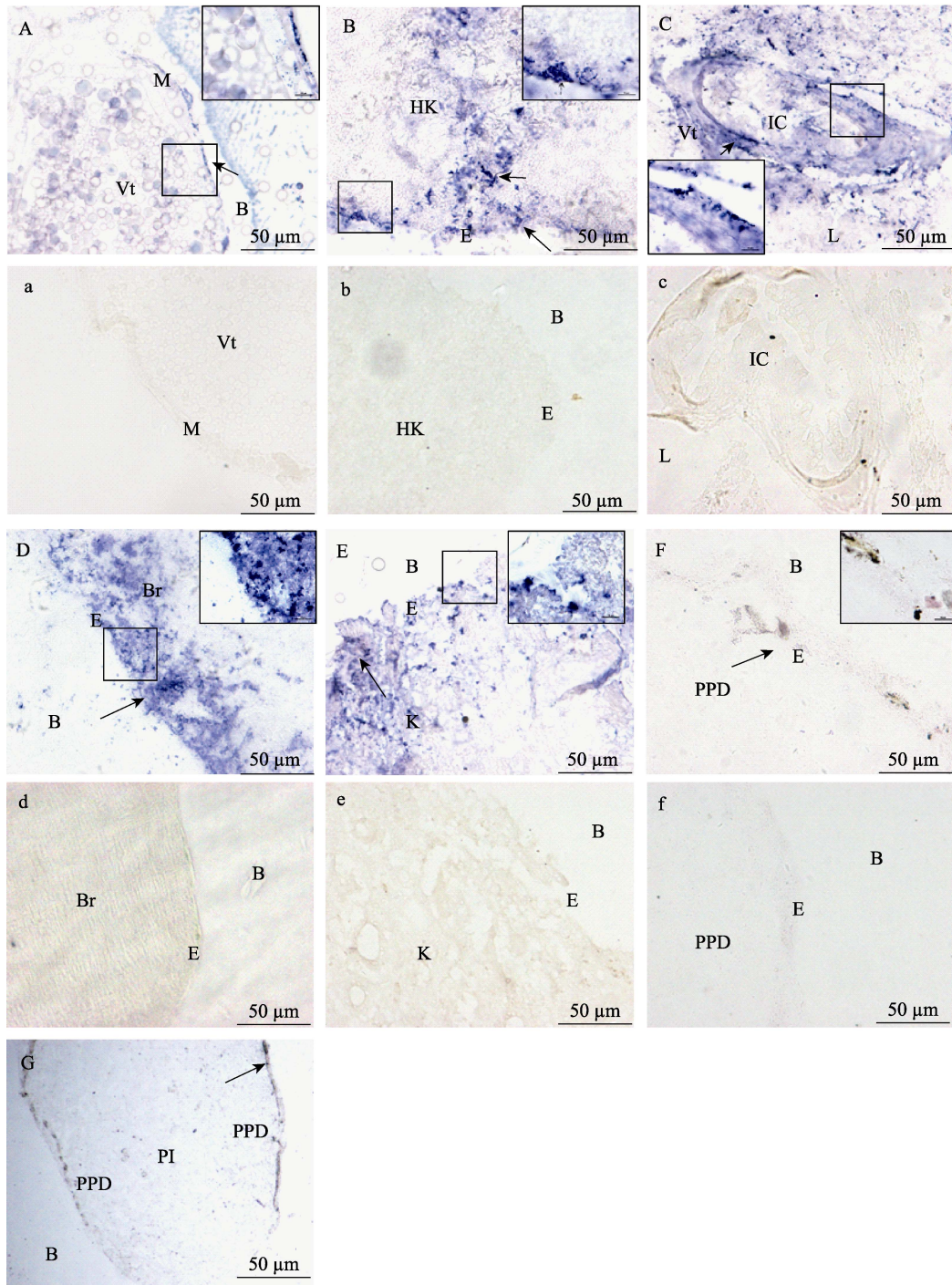


图5 半滑舌鳎 *mPRA* mRNA 在不同组织中的表达(200倍)

Fig.5 The expression of *mPRA* mRNA in different tissues of *C. semilaevis* ($\times 200$)

- A: 卵巢; B: 头肾; C: 肝脏; D: 脑; E: 肾; F: 垂体; G: 垂体(100倍); 角图为相应组织放大1000倍, 箭头指向为阳性信号位置; a、b、c、d、e和f: 卵巢、头肾、肝脏、脑、肾和垂体的对照组
- IC: 胆小管; K: 肾脏细胞; Vt: 卵黄; E: 组织边缘; L: 肝脏细胞; B: 空白区; Br: 脑细胞; HK: 头肾细胞; M: 卵母细胞膜; P: 垂体细胞; PPD: 外周部位; PI: 中间部
- A: Ovary; B: Head-kidney; C: Liver; D: Brain; E: Kidney; F: Pituitary; G: Pituitary ($\times 100$), the arrows indicated the positive reaction; the corner of pictures were $\times 1000$;
- a, b, c, d, e, and f: Control group of ovary, head-kidney, liver, brain, kidney, and pituitary
- IC: Ile canalculus; K: Kidney; Vt: Vitellogenetic oocytes; E: Edge of tissues; L: Liver; B: Blank; Br: Brain cell; HK: Head-kidney cell; M: Oocyte membrane; PPD: Proximal part distalis; PI: Pars intermedia

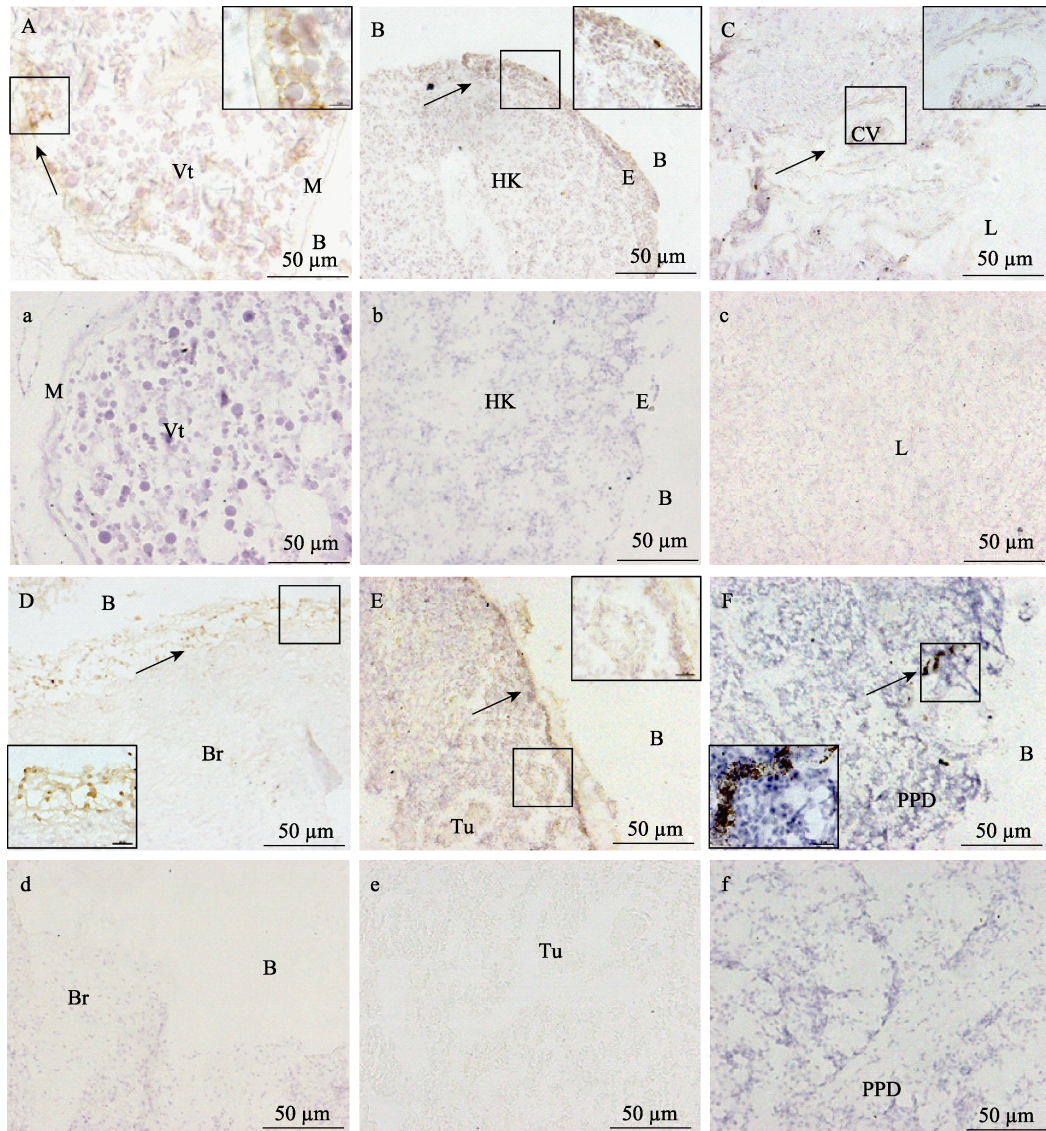


图 6 半滑舌鲷 mPR α 蛋白在不同组织中的表达分布(200 倍)

Fig.6 The expression distribution of mPR α protein in different tissues of *C. semilaevis* ($\times 200$)

A: 卵巢; B: 头肾; C: 肝脏; D: 脑; E: 肾; F: 垂体; 角图为相应组织放大 1000 倍; 箭头指向为阳性信号位置; a、b、c、d、e 和 f: 卵巢、头肾、肝脏、脑、肾和垂体的对照组

Tu: 肾小管; K: 肾脏细胞; Vt: 卵黄; E: 组织边缘; L: 肝脏细胞; B: 空白区; Br: 脑细胞; HK: 头肾细胞;

M: 卵母细胞膜; P: 垂体细胞; PPD: 外周部位; CV: 肝静脉

A: Ovary; B: Head-kidney; C: Liver; D: Brain; E: Kidney; F: Pituitary; the corner pictures were $\times 1000$; The arrows indicated the positive reaction; a, b, c, d, e, and f: Control group of ovary, head-kidney, liver, brain, kidney, and pituitary

Tu: Tubules; K: Kidney; Vt: Vitelogenic oocytes; E: Edge of tissues; L: Liver; B: Blank; Br: Brain cell;

HK: Head-kidney cell; M: Oocyte membrane; PPD: Proximal part distalis; CV: Central venous

RNA 原位杂交、免疫组化结果显示, *mPR α* mRNA 和蛋白都在卵巢成熟期的卵母细胞膜上显著表达, 在垂体、脑中, 主要在外周部分表达。半滑舌鲷 *mPR α* mRNA 和蛋白在脑、垂体、性腺中的丰富表达, 说明了 *mPR α* 参与介导孕激素调控半滑舌鲷繁殖内分泌系统。硬骨鱼类在生长、发育和繁殖过程中, 体内的神经、免疫及内分泌三大系统起到重要的作用; 性类

固醇激素受体不仅存在于性腺中, 在脑及免疫相关组织中也大量存在, 通过 3 个系统之间的反馈作用, 在神经-内分泌-免疫网络中起重要作用(Pakdel *et al*, 1997)。本研究用 RNA 原位杂交、免疫组化以及 Western blotting 方法在雌性半滑舌鲷的免疫相关组织肝、肾、头肾中检测到 *mPR α* mRNA 和蛋白表达, 在头肾、肾主要显色在组织的外周部分。在肝脏主要

显色在胆小管和肝静脉等与外界联系的管腔周围,在肾脏中也观察到其在肾小管附近表达丰富。因此,孕激素可能通过和其他系统交互连接部位和组织建立联系,从而行使其调控半滑舌鳎机体免疫系统的功能,但 mPR α 调控免疫系统的机理当前并不清楚。

综上所述, mPR α 不仅在介导孕激素促进半滑舌鳎卵母细胞成熟的生理功能上发挥重要的作用,而且参与介导孕激素调控雌性半滑舌鳎机体的神经-内分泌-免疫网络系统,但其作用机制尚不明了,进一步的关联分析,将会为解析膜孕激素受体作用机制提供广阔的前景。另外,膜孕激素受体 mPR(α 、 β 、 γ)和孕酮受体膜组分 PGRMC(1、2)均为膜孕激素受体家族成员,在组织表达上存在重叠分布,因此,单独分析膜孕激素受体亚型的作用机制仍有一定技术挑战。尽管核孕激素受体(nPR)不像膜孕激素受体具有跨膜蛋白区域,但参与膜孕激素受体介导的信号通路,这也增加了膜孕激素受体研究的复杂性。本研究为进一步研究膜孕激素受体生理功能提供了组织学依据。

参 考 文 献

- Arck P, Hansen PJ, Biserka MJ, *et al.* Progesterone during pregnancy: Endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2007, 58(3): 268–279
- Frye CA, Walf AA, Kohtz AS, *et al.* Progesterone-facilitated lordosis of estradiol-primed mice is attenuated by knocking down expression of membrane progesterin receptors in the midbrain. *Steroids*, 2014, 81(3): 17–25
- Hanna RN, Zhu Y. Expression of membrane progesterin receptors in zebrafish (*Danio rerio*) oocytes, testis and pituitary. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 161(1): 153–157
- Kazeto Y, Goto-Kazeto R, Thomas P, *et al.* Molecular characterization of three forms of putative membrane-bound progesterin receptors and their tissue-distribution in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2005a, 34(3): 781–791
- Kazeto Y, Goto-Kazeto R, Trant JM. Membrane-bound progesterin receptors in channel catfish and zebrafish ovary: Changes in gene expression associated with the reproductive cycles and hormonal reagents. *General and Comparative Endocrinology*, 2005b, 142(1–2): 204–211
- Liu XZ, Xu YJ, Liu NZ, *et al.* Study on histological and morphometric characters of gonad development of *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(6): 25–35 [柳学周, 徐永江, 刘乃真, 等. 半滑舌鳎卵巢发育的组织学和形态数量特征研究. *渔业科学进展*, 2009, 30(6): 25–35]
- Liu XZ, Shi B, Li XX, *et al.* Molecular characterization of the novel membrane progesterin receptor gene and its role during ovarian development in the half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(4): 608–619 [柳学周, 史宝, 李晓晓, 等. 半滑舌鳎新型膜孕激素受体基因分子特征及其在卵巢发育过程的作用. *中国水产科学*, 2015, 22(4): 608–619]
- Liu XZ, Zhuang ZM, Ma AJ, *et al.* Operative technologies for seedling rearing of *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Marine Fisheries Research*, 2006, 27(2): 17–24 [柳学周, 庄志猛, 马爱军, 等. 半滑舌鳎苗种生产技术的开发研究. *海洋水产研究*, 2006, 27(2): 17–24]
- Liu XZ, Zhuang ZM, Ma AJ, *et al.* Reproductive biology and breeding technology of *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Marine Fisheries Research*, 2005, 26(5): 9–16 [柳学周, 庄志猛, 马爱军, 等. 半滑舌鳎繁殖生物学及繁育技术研究. *海洋水产研究*, 2005, 26(5): 9–16]
- Lu J, Reese J, Zhou Y, *et al.* Progesterone-induced activation of membrane-bound progesterone receptors in murine macrophage cells. *Journal of Endocrinology*, 2015, 224(2): 183–194
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- Masui Y, Markert CL. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *Journal of Experimental Zoology*, 1971, 177(2): 129–145
- Mourot B, Nguyen T, Fostier A, *et al.* Two unrelated putative membrane-bound progesterin receptors, progesterone membrane receptor component 1 (PGRMC1) and membrane progesterin receptor (mPR) beta, are expressed in the rainbow trout oocyte and exhibit similar ovarian expression patterns. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2006, 4(1): 1–14
- Nagahama Y, Yoshikuni M, Yamashita M, *et al.* Regulation of oocyte maturation in fish. *Development Growth and Regeneration*, 2008, 50(Suppl 1): S174
- Nagahama Y. Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads. *Zoological Science*, 1987, 4: 209–222
- Oshima T, Nakayama R, Roy SR, *et al.* Purification of the goldfish membrane progesterin receptor α (mPR α) expressed in yeast *Pichia pastoris*. *Biomedical Research*, 2014, 35(1): 47–59
- Pace MC, Thomas P. Activation of a pertussis toxin-sensitive, inhibitory G-protein is necessary for steroid-mediated oocyte maturation in spotted seatrout. *Developmental Biology*, 2005, 285(1): 70–79
- Pakdel F, Delaunay F, Ducouret B, *et al.* Regulation of gene expression and biological activity of rainbow trout estrogen receptor. *Kidney International Supplement*, 1988, 25(3): S104–S109
- Shi B, Li XX, Liu XZ, *et al.* Molecular cloning and tissue expression analysis of membrane progesterin receptor alpha gene (mPR α) from half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(3): 61–67 [史宝, 李晓晓, 柳学周, 等. 半滑舌鳎膜孕激素受体基因克隆与组织表达分析. *渔业科学进展*, 2013, 34(3): 61–67]
- Tan W, Aizen J, Thoas P. Membrane progesterin receptor alpha mediates progesterin-induced sperm hypermotility and increased fertilization success in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *General and Comparative Endocrinology*, 2014a, 200: 18–26

- Tan W, Thomas P. Activation of the Pi3k/Akt pathway and modulation of phosphodiesterase activity via membrane progesterin receptor-alpha (mPR α) regulate progesterin-initiated sperm hypermotility in Atlantic croaker. *Biology of Reproduction*, 2014b, 90(5): 105
- Thomas P, Pang Y, Dong J. Enhancement of cell surface expression and receptor functions of membrane progesterin receptor α (mPR α) by progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1): Evidence for a role of PGRMC1 as an adaptor protein for steroid receptors. *Endocrinology*, 2014, 155(3): 1107–1119
- Thomas P. Rapid steroid hormone actions initiated at the cell surface and the receptors that mediate them with an emphasis on recent progress in fish models. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, 175(3): 367–383
- Tokumoto M, Nagahama Y, Thomas P, *et al.* Cloning and identification of a membrane progesterin receptor in goldfish ovaries and evidence it is an intermediary in oocyte meiotic maturation. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 145(1): 101–108
- Tokumoto T, Tokumoto M, Oshima T, *et al.* Characterization of multiple membrane progesterin receptor (mPR) subtypes from the goldfish ovary and their roles in the induction of oocyte maturation. *General and Comparative Endocrinology*, 2012a, 177(1): 168–176
- Tokumoto T. Identification of membrane progesterin receptors (mPR) in goldfish oocytes as a key mediator of steroid non-genomic action. *Steroids*, 2012b, 77(10): 1013–1016
- Tubbs C, Psce M, Thomas P. Expression and gonadotropin regulation of membrane progesterin receptor alpha in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) gonads: Role in gamete maturation. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(1): 144–154
- Yang ZY, Wang CX. On the development of flatfish aquaculture industry of China: A global perspective. *Chinese Fisheries Economics*, 2009(6): 115–121 [杨正勇, 王春晓. 全球视野下中国鲆鲽类养殖业的发展. *中国渔业经济*, 2009(6): 115–121]
- Zhao WX, Wright RS. Sex steroids production by vitellogenic ovarian follicles of Atlantic salmon (*Salmo salar*) *in vitro*. *Journal of Fisheries of China*, 1986(4): 389–394 [赵维信, Wright RS. 促性腺激素诱发大西洋鲑卵黄发生期卵巢滤泡释放性类固醇激素的离体研究. *水产学报*, 1986(4): 389–394]

(编辑 冯小花)

The Expression Patterns of Membrane Progesterin Receptor α (mPR α) During Oocytes Maturation in *Cynoglossus semilaevis*

LI Xiaoni^{1,3}, LIU Xuezhou^{1,2,3}①, SHI Bao^{1,2}, XU Yongjiang^{1,2}, ZHANG Jinyong^{1,3}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. Dalian Ocean University, Dalian 110623)

Abstract In this study we investigated the expression patterns of the mRNA and proteins of membrane progesterin receptor alpha (mPR α) in different tissues and oocyte phases using quantitative real-time PCR (qRT-PCR), *in situ* hybridization, immunohistochemistry, and western blotting analysis. Mature tissue samples were collected from female half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. After *in vitro* incubation with or without human chorionic gonadotropin (HCG), the levels of mPR α mRNA and proteins in the oocytes at different developmental stages were measured with qRT-PCR and western blotting analysis. It was shown that the highest level of mPR α mRNA appeared in Phase V oocyte of mature *C. semilaevis*. 20 IU/ml HCG promoted the mRNA and protein expression more effectively than 10 IU/ml HCG. This further implied that mPR α was involved in the regulation of oocyte maturation through guiding progesterone. The western blotting analysis confirmed that the expression of mPR α proteins was higher in the brain, pituitary, and ovary than in other tissues. These results indicated that mPR α could play certain roles in different tissues, especially the endocrine-related ones. Results of *in situ* hybridization and immunohistochemistry clearly showed that the mPR α mRNA and proteins were expressed on the oocyte membrane and the peripheral or bureaucratic structures of other organs. Our study enriched the knowledge about mechanisms of membrane receptor signal transduction.

Key words Membrane progesterone receptor; *Cynoglossus semilaevis*; *in situ* hybridization; Immunohistochemistry; Western blotting; qRT-PCR

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

mPR α 在性成熟雌性牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) 不同组织中的定性定量表达特征*



李晓妮^{1,3} 柳学周^{1,2,3} 史宝^{1,2} 徐永江^{1,2} 李晓晓^{1,2} 张金勇^{1,3}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物
产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 大连海洋大学 大连 110623)

摘要 通过荧光实时定量 PCR 方法(qRT-PCR)检测雌性性成熟牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)第 V 时期不同时相的卵母细胞中膜孕激素受体(mPR α)的表达,同时采用原位杂交、免疫组化和 Western blotting 方法研究性成熟雌性牙鲆 mPR α mRNA 和蛋白在各组织中的分布和表达。qRT-PCR 结果显示,在牙鲆卵巢成熟时期的第 V 时相卵母细胞, mPR α mRNA 的表达量最高,表明 mPR α 介导孕激素参与了牙鲆卵母细胞成熟的调控。组织定量定位结果显示,在牙鲆的卵巢、脑、头肾、肾、肝脏组织中均有 mPR α mRNA 和蛋白表达存在,且在脑、卵巢中表达量较高,表明 mPR α 在牙鲆不同组织中都发挥着一定的作用,且在内分泌相关组织如脑和卵巢中的作用更明显。原位杂交和免疫组化结果显示, mPR α mRNA 和蛋白表达明显定位在牙鲆卵母细胞膜上,且分布在其他组织的管腔结构。本研究为进一步探究牙鲆 mPR α 信号转导机制提供了理论基础和形态学依据。

关键词 膜孕激素受体; 牙鲆; 原位杂交; 免疫组化; Western blotting; 组织表达

中图分类号 S961 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0034-08

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)个体大、肉质细嫩鲜美,经济价值高,是我国海水增殖重要的鱼类之一。近几年,对于牙鲆的研究主要集中在生化因子(温度、盐度、光照周期、光照强度)对牙鲆各个生化指标的影响、基因克隆和表达、生长、家系、疾病等方向。环境胁迫、温度、光照、养殖密度等对牙鲆繁殖内分泌功能的影响日益引起了国内外学者的关注。但关于牙鲆性腺发育成熟过程中的膜孕激素受体(mPR)的调控机制的研究却鲜有报道(史宝, 2010)¹⁾。

在孕激素诱导鱼类卵母细胞成熟过程中,不是通过激活卵母细胞内的核类固醇受体发挥生理作用,而是通过结合在细胞表面的膜受体快速地发挥生理功能。膜孕激素受体(mPRs)在孕激素参与的调控过程中起介导作用,自 Patiño 等(1990)首次报道在硬骨鱼类中发现云纹犬牙石首鱼(*Cynoscion nebulosus*)的卵巢组织中存在 mPR 以后,对于硬骨鱼类 mPRs 的研究逐渐开展起来。mPRs 在卵母细胞成熟中发挥生理调节作用最有说服力的证据是在研究硬骨鱼类卵母细

* 国家自然科学基金项目(31201982)、国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50)、山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2013SW042)共同资助 [This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31201982), China Agriculture Research System (CARS-50), and Shandong Youth Scientist Awards Foundation (BS2013SW042)]
李晓妮, E-mail: 857903563@qq.com

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-11-05, 收修改稿日期: 2015-12-26

1) Shi B. Study on the molecular mechanisms of reproductive endocrinology in *Paralichthys olivaceus* and *Paralichthys lethostigma*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2010, 1-176 [史宝. 牙鲆繁殖内分泌分子机理研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010, 1-176]

胞的孕激素受体中获得的, Zhu 等(2003)从云纹犬牙石首鱼卵巢中克隆了该膜受体 cDNA 序列,随后在其他多种鱼类中发现有 *mPRs* 家族成员的存在 (Tokumoto *et al*, 2006; Hanna *et al*, 2006; 史宝, 2010¹⁾、2013; 柳学周等, 2015)。Tokumoto 等(2006)研究证明, 金鱼(*Carassius auratus*)的卵母细胞膜上有 *mPR α* 蛋白表达。虽然前期实验克隆出牙鲆的 *mPR α* 基因,但目前还没有对 *mPR α* 基因在牙鲆组织上的表达定位研究的报道。

本研究使用 qRT-PCR、Western blotting、原位杂交和免疫组化等方法研究牙鲆 *mPR α* mRNA 和蛋白在不同组织和不同发育时相卵母细胞中的表达特征,探讨 *mPR α* 在卵母细胞成熟发生过程中的作用。对牙鲆 *mPR α* 在脑和卵巢中的表达研究,可以进一步了解牙鲆的繁殖机理,为养殖生产提供新的理论参考,从而更有效地调控牙鲆的繁殖以提高它们的繁殖能力,进一步推动鲆类产业发展。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用牙鲆雌鱼采自山东青岛忠海水产有限公司,为野生亲鱼自然产卵后人工育苗得到的健康苗种,经室内人工养成达到性成熟的 F₁ 代亲鱼。牙鲆雌鱼全长为 40–60 cm,体重为 1428.7–2508.3 g,其培育条件:全年开放流水培育,水温为 8–25℃,盐度为 27–31, pH 为 7.8–8.4,溶解氧 5 mg/L 以上。在牙鲆繁殖季节,挑选腹部膨大、松软的亲鱼,使用 MS-222 麻醉雌鱼后解剖,按照牙鲆卵巢发育的组织学特征,在显微镜下将卵母细胞按时相分类取样,从发育 V 期卵巢分离到 II、III、IV、V 和 VI 时相卵母细胞,用液氮将卵母细胞速冻并–80℃保存,用于总 RNA 提取。雌鱼麻醉后解剖、留取各组织样品:在 4℃条件下使用 4%多聚甲醛(溶于 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 PBS 中)固定 20 h,梯度甲醇(25%、50%、75%和 100%甲醇溶于 0.01 mol/L PBS)脱水,在–20℃条件下保存于甲醇中的样品,一部分用于免疫组化,一部分样品用于原位杂交;部分性腺组织固定在 Davidsons's AFA 中,用于验证性腺发育状况;使用液氮速冻后保存在–80℃的组织样品,用于总蛋白的提取。

1.2 实验试剂

Hind III 和 *EcoR* I 内切酶, T4 DNA 快速连接酶购自 NEB, Dig RNA Labeling Kit(SP6/T7)碱性磷酸酶标记的地高辛抗体以及 NBT/BCIP 显色试剂盒购

自 Roche 公司。引物的合成由 TaKaRa 生物公司完成; Trans5 α (DH5 α)表达菌感受态细胞、动物组织蛋白提取试剂购自北京全式金公司(TransGen Biotech); HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体购自上海生工公司。*Taq* 聚合酶、SYBR Premix Ex *Taq*、RNAiso Plus、DNA marker 和 RNA 酶抑制剂购自 TaKaRa 公司,蛋白浓度测定试剂盒购自 Thermo Scientific 公司,多聚甲醛、MS-222 购自 Sigma 公司,去离子甲酰胺购自 AMRESCO 公司,蛋白酶 K 购自默克公司,山羊血清购自博奥森公司,蛋白胨和酵母粉购自 OXOID 公司。

1.3 总 RNA 提取、cDNA 的合成和荧光定量 PCR

牙鲆 *mPR α* mRNA 在第 V 时期的不同发育阶段卵母细胞的表达分析:每个卵母细胞发育时相设置 4 个重复,从第 V 时期的牙鲆中分别挑取 II、III、IV、V 和 VI 时相卵母细胞,提取总 RNA 进行反转录并参照 TaKaRa 公司的 PrimerScriptTM RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒合成 cDNA 第一链并用于基因表达分析。正反引物分别为 YP-*mPR α* -F(TCTTGGTGAA GTGGCAGGAGAT)和 YP-*mPR α* -R(CGCTGAAGGAG AGGTAGGTGAA)。荧光实时定量 PCR(qRT-PCR)反应体系 20 μ l: 1 μ l cDNA 模版, 0.5 μ l 引物(10 μ mol/L), 10 μ l SYBR Premix Ex*Taq*TM II 和 8 μ l ddH₂O。采用两步法 PCR 扩增程序,反应条件为 95℃预变性 30 s, 95℃ 5 s, 58.5℃ 30 s 共 40 个循环。使用 β -actin 基因 (β -actinF: 5'-GAAATCGCCGCACTGGTT-3'; β -actinR: 5'-GCCCATACCCACCATCACTC-3')作为内参对照,用以校正所有样品中 RNA 的量。qRT-PCR 及信息的收集都在 Mastercycler ep *realplex* 实时定量 PCR 仪(Eppendorf 公司)上进行。程序运行完成后进行熔解曲线分析以确定引物及反应是否正常。每个样品设置 3 个平行复孔,重复 3 次实验,设阴性对照,以确认实验结果的可靠性。

1.4 *mPR α* /pBST-18 质粒的构建

根据牙鲆 *mPR α* cDNA 序列,设计引物,由大连宝生物合成。上游: 5'-AAGCTTAGCCCTGTGGTTTCA CCGCATC-3'; 下游: 5'-GAATTCAACGGCAGGTACA CGCTTTCG-3'。预期扩增产物长度为 360 bp。扩增条件: 94℃预变性 5 min, 94℃变性 30 s, 65℃复性 30 s, 72℃延伸 1 min, 重复 30 个循环,最后 72℃延伸 10 min, 1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。重组质粒构建: 采用凝胶回收试剂盒回收并纯化 PCR 产物。分别用限制性内切酶 *Hind* III 和 *EcoR* I 对回收的 PCR 产物和载体 pBST-18 进行双酶切, 1%琼脂糖凝

胶电泳检测后,试剂盒回收。通过 T4 快速连接酶进行连接,将 PCR 产物克隆到 pBST-18 载体中。再将连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,挑取 PCR 检测阳性克隆,扩增培养,小量提取质粒,用 *Hind* III 和 *Eco*R I 进行双酶切鉴定,然后测序验证。

1.5 地高辛标记 *mPR α* 正、反义 RNA 探针的合成和纯化

将扩增后的阳性菌落提取的质粒分别用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Eco*R I 酶切,使其完全线性化,1%琼脂糖电泳检测并回收。回收的酶切片段即为合成正、反义 RNA 探针的模板。按 Roche 公司的 DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) 试剂盒说明书分别用 SP6、T7 转录酶进行体外转录,详细操作参照产品说明书,合成地高辛标记的正、反义 RNA 探针。合成的 RNA 探针用 1%琼脂糖电泳和紫外分光光度计鉴定检测。

1.6 原位杂交分析 *mPR α* mRNA 在成熟雌鱼各组织中的定位

采用 Roche 公司的 DIG Wash and Block Buffer Set、Blocking Reagent 和 NBT/BCIP Stock Solution 试剂盒进行。二甲苯脱蜡处理 3 次(每次 5 min),无水乙醇处理 2 次(每次 10 min),95%、70%、50%乙醇各 5 min 逐级脱水。4% PFA-PBS 固定 10 min。PBS 洗涤 3 次,每次 10 min。0.2 mol/L 的 HCl 处理 10 min。PBST 冲洗 2 次,每次 10 min。10 μ g/ml 蛋白酶 K 消化 10 min。PBST 冲洗 3 次(每次 5 min)。加入含 tRNA 和肝素预杂交液,70 $^{\circ}$ C 预杂交 8 h,再加入反义 RNA 探针 200 ng 的杂交液,70 $^{\circ}$ C 过夜。50%无 tRNA 和肝素的预杂交液和 50% 2 \times SSC、70 $^{\circ}$ C,15 min,0.2 \times SSC、70 $^{\circ}$ C,1 h。1 \times MAB 室温 5 min。含 10%山羊羊血清的封闭液室温封闭,6 h。1:500 封闭液稀释的抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜。PBST 室温冲洗 6 次(每次 15 min);碱性磷酸缓冲液室温 2 次(每次 10 min)。加 200 μ l BCIP/NBT 底物溶液,置黑暗处显色,观察颜色变化。待显色达到理想着色后,PBST 洗涤 5 次(每次 5 min)终止反应,4% PFA-PBS 固定 10 min,PBST 洗 3 次(每次 5 min);酒精梯度脱水、二甲苯透明,封片,拍照。

1.7 成熟雌鱼各组织中 *mPR α* 蛋白定量表达

取冻存的各组织(约 100 mg),加入 1 ml 动物组织蛋白提取试剂,使用 Pro 精密手持匀浆器充分匀浆,冰浴中静置 30 min,于 4 $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 30 min,取上清液即得到组织蛋白提取液。12% SDS-PAGE 电泳检测提取蛋白的质量,并使用蛋白测定试剂盒测定组织总蛋白浓度。

分析牙鲆 *mPR α* 蛋白序列选择抗原表位,合成相应的免疫多肽;将合成的多肽常规免疫新西兰大白兔,制备抗体。使用多克隆抗体进行 Western blotting 检测。12% SDS-PAGE 蛋白电泳,每孔上样量约 80 μ g,220 V 25 min。缓冲液泡凝胶 15 min,转印按胶的大小剪滤纸和 PVDF 膜,将滤纸在缓冲液中浸泡 15 min。PVDF 膜甲醇中浸泡 1 min,缓冲液中浸泡 15 min 活化,按阳极-滤纸-PVDF 膜-凝胶-滤纸-阴极的顺序放入半干式转膜仪 400 mA 25 min,取出 PVDF 膜,1 \times PBST 洗涤。5%脱脂奶粉溶液封闭(1 \times PBST 稀释)室温 3 h,洗涤,加一抗和 3%BSA(1:2000),摇床,室温 2 h,洗涤。二抗(羊抗兔 IgG 抗体)(1 \times PBST 1:2000 稀释)摇床,室温 2 h,洗涤,DAB 显色拍照,分析灰度。

1.8 *mPR α* 蛋白在成熟雌鱼各组织中的定位表达

将保存在 100%甲醇中的样品取出,使用无水乙醇处理 2 次,每次 10 min;二甲苯透明,石蜡包埋,7 μ m 厚度石蜡切片,37 $^{\circ}$ C 烘干。具体免疫组化切片处理过程和条件如下(阴性对照:1 \times PBS 代替一抗,其余步骤同下):二甲苯脱蜡 2 次,每次 5 min;梯度乙醇复水各 3 min;1 \times PBST 洗涤;3% H₂O₂(溶于甲醇中)室温孵育 15 min 封闭内源酶;洗涤;0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液微波炉加热沸腾后,中低档保持 95 $^{\circ}$ C 20 min,自然冷却至室温修复抗原;洗涤;3% BSA 封闭(溶于 1 \times PBST)摇床上室温振摇 2 h;抗 *mPR α* 抗体稀释(1:1000),溶于 3% BSA 滴加到载玻片上,使其完全覆盖组织切片,湿盒中室温过夜;洗涤;二抗即羊抗兔 IgG 抗体(1:1000 稀释在 1 \times PBST 中)滴加到载玻片上,湿盒中室温 1 h;洗涤;DAB 显色;洗涤;苏木精染液复染 3-5 min;0.1% HCl 分化复蓝,立即自来水冲洗;梯度乙醇脱水;二甲苯透明 2 min;封片;拍照。

1.9 数据统计分析

使用 SPSS 17.0 软件中的单因素方差分析(One-way ANOVA)(Tukey's HSD 检验)、Duncan's 多重比较分析和 AIC.AlphaView 成像分析系统(Cell Biosciences Inc)分析蛋白灰度。 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 第 V 期卵母细胞不同时期 *mPR α* mRNA 相对表达量比较

将牙鲆成熟期卵巢中卵母细胞分为 5 个时期。如图 1 所示,*mPR α* 基因的表达最高值出现在牙鲆发育 V 时相的卵母细胞($P < 0.05$)。表明 *mPR α* 在卵母细胞的成熟期 V 时相发挥重要的作用,其他时期有表达,但表达量低于 V 时相(图 1)。

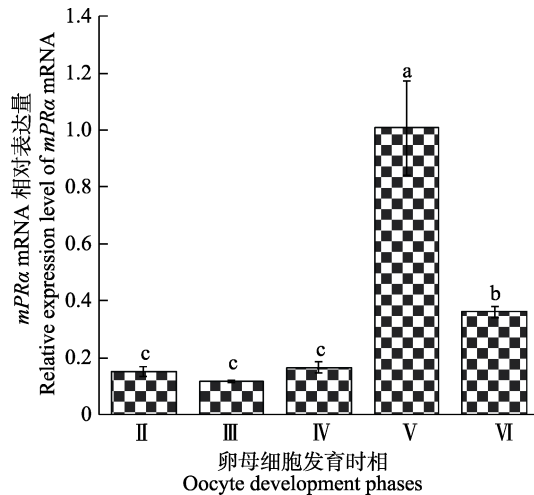


图 1 牙鲆卵母细胞不同时相 *mPR α* mRNA 相对表达
Fig.1 The relative expression of *mPR α* mRNA at different oocyte phases of *P. olivaceus*

不同字母间差异显著 ($P < 0.05$)

Different letters represent significant difference ($P < 0.05$)

2.2 *mPR α* 蛋白和 mRNA 在不同组织中的表达

对牙鲆不同组织中 *mPR α* 总蛋白表达量进行 Western-blotting 检测, 结果见图 2, *mPR α* 蛋白表达

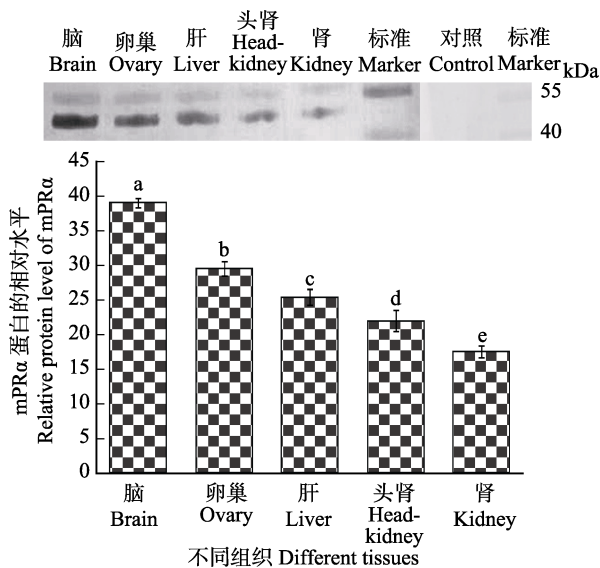


图 2 牙鲆各组织 *mPR α* 蛋白表达量
Fig.2 The expression of *mPR α* protein in each tissue of *P. olivaceus*

量在脑、卵巢中相对较高, 其他组织中也有表达, 但表达量相对较少。

用所标记的正反义探针分别与牙鲆卵巢、肝脏、头肾、肾脏、脑组织中 mRNA 进行原位杂交反应。如图 3 所示, 作为阳性对照的 A、B、C、D、E、F、G 反义探针显示阳性结果, 作为阴性对照的图 3-a、b、c、d、e、f 的正义探针没有杂交显色信号。用多克隆抗体分别与牙鲆卵巢、肝脏、头肾、肾脏、脑组织蛋白进行免疫反应, 结果如图 4 所示, 一抗孵育的 A、B、C、D、E、F, 放大结果 1、2、3、4、5、6 显示免疫显色结果, 用 1×PBS 代替一抗孵育作为阴性对照的图 4-a、b、c、d、e、f 的没有免疫显色信号。

图 3-A 和图 4-A 显示, 在成熟卵巢组织中, *mPR α* mRNA 和蛋白在卵母细胞膜上显著性表达。图 3-B、C、D、E 显示, 在其他组织中有 *mPR α* mRNA 表达, 但定位不明显。图 4-B、D 显示, *mPR α* 蛋白在头肾、脑中有表达。图 3-C 和图 4-C 图显示, 在肝脏, *mPR α* 蛋白主要在胆小管周围显色。图 3-E 和图 4-E 显示, *mPR α* 蛋白主要在肾脏的肾小管部位表达。

3 讨论

3.1 *mPR α* 在卵母细胞成熟过程中的表达分析

在多种硬骨鱼类中发现 mPRs 的存在(Tokumoto *et al*, 2006; Berg *et al*, 2005; Hanna *et al*, 2006)。史宝(2010)¹⁾首先在牙鲆中克隆得到了 *mPR α* 全长序列, 李晓晓(2013)²⁾研究发现, *mPR α* mRNA 在雌性牙鲆卵巢不同的繁殖周期中均有表达, 当卵巢发育至 V 期时, *mPR α* 的表达量达到最大值。本研究通过实时荧光定量技术分析牙鲆卵巢发育至 V 期不同时相卵母细胞的表达, 结果显示, *mPR α* mRNA 表达的最高值出现在第 V 时相卵母细胞中; 处于第 V 时相卵母细胞 *mPR α* mRNA 的高表达量进一步证明, *mPR α* 在介导孕激素促进卵母细胞成熟的生理调节功能上发挥重要的作用。*mPR α* 参与诱导卵母细胞成熟在硬骨鱼类中已有报道(Kazeto *et al*, 2005a、b; Thomas *et al*, 2004; Tokumoto *et al*, 2012), 但本研究首次将 *mPR α* 表达研究范围扩展到牙鲆卵母细胞不同时相中。RNA 原位

1) Shi B. Study on the molecular mechanisms of reproductive endocrinology in *Paralichthys olivaceus* and *Paralichthys lethostigma*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2010, 1-176 [史宝. 牙鲆繁殖内分泌分子机理研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010, 1-176]

2) Li XX. Study on the physiological function of membrane progesterin receptor in the reproductive cycle of flatfish. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013, 1-73 [李晓晓. 膜孕激素受体在鲆鲽类繁殖周期中的生理功能研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 1-73]

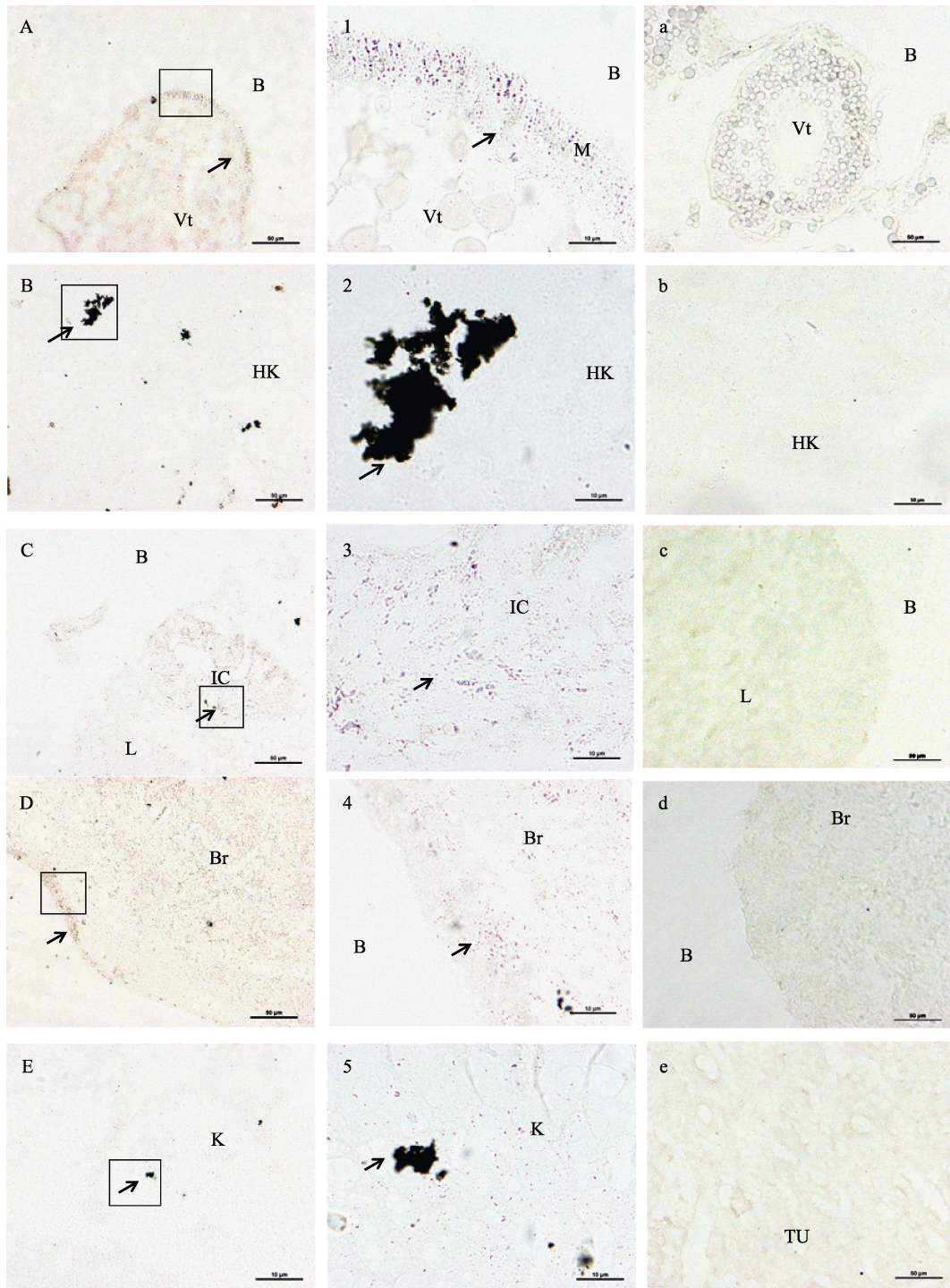


图3 牙鲆 *mPRa* mRNA 在不同组织中的表达(200倍)

Fig.3 The expression of *mPRa* mRNA in different tissues of *P. olivaceus* (×200)

A: 卵巢; B: 头肾; C: 肝脏; D: 脑; E: 肾; 1、2、3、4、5为放大1000倍, 箭头指向为阳性信号位置;
a、b、c、d和e: 卵巢、头肾、肝脏、脑和肾的对照组

IC: 胆小管; TU: 肾小管; K: 肾脏细胞; Vt: 卵黄; E: 组织边缘; L: 肝脏细胞; B: 空白区; Br: 脑细胞;
HK: 头肾细胞; M: 卵母细胞膜

A: Ovary; B: Head-kidney; C: Liver; D: Brain; E: Kidney; Note: 1, 2, 3, 4, and 5: ×1000 times; the arrows indicated the positive reaction; a, b, c, d, and e: Control group of ovary, head-kidney, liver, brain, and kidney
IC: Ile canaliculus; TU: Tubules; K: Kidney; Vt: Vitelo genic oocytes; E: Edge of tissues; L: Liver; B: Blank; Br: Brain cell;
HK: Head-kidney cell; M: Oocyte membrane

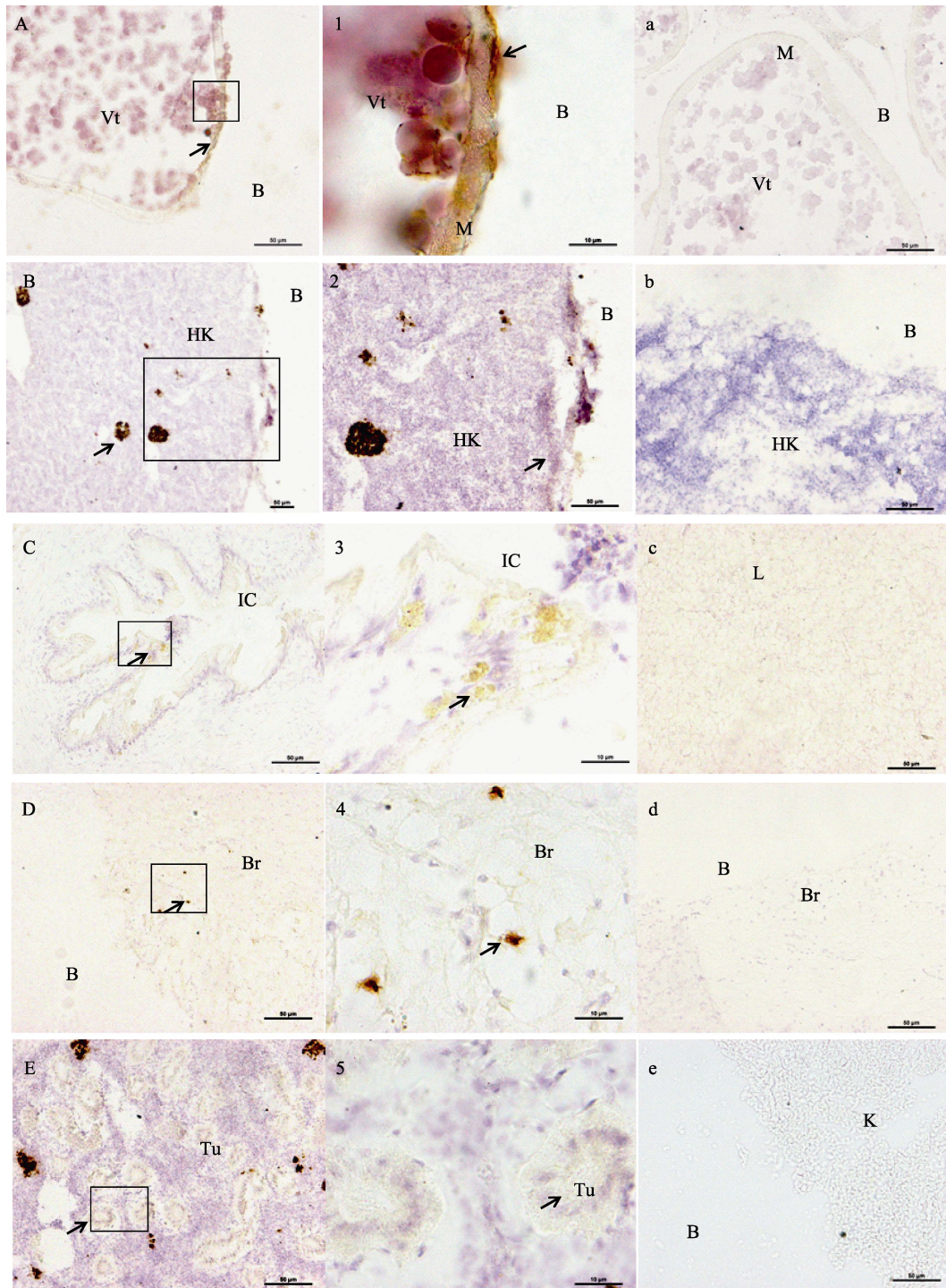


图 4 牙鲈 mPR α 蛋白在不同组织中的分布(200 倍)

Fig.4 The distribution of mPR α protein in different tissues of *P. olivaceus* ($\times 200$)

A: 卵巢; B: 头肾(100 倍); C: 肝脏; D: 脑; E: 肾; 注: 1、3、4、5 图为放大 1000 倍; 2 为放大 200 倍, 箭头指向为阳性信号位置; a、b、c、d 和 e: 卵巢、头肾、肝脏、脑和肾的对照组
 IC: 胆总管; Tu: 肾小管; K: 肾脏细胞; Vt: 卵黄; E: 组织边缘; L: 肝脏细胞; B: 空白区; Br: 脑细胞;
 HK: 头肾细胞; M: 卵母细胞膜
 A: Ovary; B: Head-kidney ($\times 100$); C: Liver; D: Brain; E: Kidney; Note: 1, 3, 4, and 5: $\times 1000$ times; 2: $\times 200$; the arrows indicated the positive reaction; a, b, c, d, and e: Control group of ovary, head-kidney, liver, brain, and kidney
 IC: Ile canalculus; Tu: Tubules; K: Kidney; Vt: Vitellogenic oocytes; E: Edge of tissues; L: Liver; B: Blank; Br: Brain cell;
 HK: Head-kidney cell; M: Oocyte membrane

杂交、免疫组化结果显示, *mPR α* mRNA 和蛋白都在牙鲆卵巢成熟期的卵母细胞膜上显著表达, 进一步证明其作为膜上受体参与孕激素的调控作用。金鱼中也发现在卵母细胞膜上有 *mPR α* 蛋白表达(Tokumoto *et al.*, 2012), 与本研究的結果相似。

3.2 *mPR α* 表达与定位分析

本研究用 Western blotting 检测 *mPR α* 蛋白在牙鲆不同组织的表达, 结果显示, *mPR α* 蛋白在性腺、脑中表达量较高, 在肝、肾、头肾组织中表达较低。RNA 原位杂交、免疫组化结果显示, *mPR α* mRNA 和蛋白都在卵巢成熟期的卵母细胞膜上显著表达, 李晓晓(2013)¹⁾发现牙鲆 *mPR α* mRNA 较丰富地表达于脑、垂体和卵巢组织, 而在头肾、肾等组织中表达相对微弱。本研究发现, 牙鲆 *mPR α* 蛋白在不同组织中的表达量分析结果和 *mPR α* mRNA 表达量变化的结果大体一致, 为 *mPR α* mRNA 在组织中的表达提供了佐证。Zhu 等(2003)采用 Northern 杂交方法在云纹犬牙石首鱼的繁殖和神经内分泌组织检测到 *mPR α* 的表达, 在成熟的云纹犬牙石首鱼的卵母细胞检测到 *mPR α* 蛋白阳性信号, 与本研究的結果相似。Kazeto 等(2005a、b)在斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)检测到 *mPR α* mRNA 表达, 主要分布在脑、垂体和性腺中。

牙鲆 *mPR α* 作为孕激素受体的一种, 其 mRNA 和蛋白在脑中表达丰富, 表明了 *mPR α* 参与介导牙鲆孕激素调控其神经内分泌系统。本研究采用 RNA 原位杂交、免疫组化以及 Western blotting 方法在性成熟雌性牙鲆的免疫相关组织(肾脏和头肾)检测到 *mPR α* mRNA 和蛋白表达, 并在肾脏的肾小管附近表达丰富; 另外, 在肝脏组织主要在胆小管中表达。因此, 在牙鲆中, 孕激素也可能通过 *mPR α* 在系统交互连接部位和组织行使其调控免疫系统的功能, 而且 *mPR α* 参与介导孕激素调控雌性牙鲆机体的神经-内分泌-免疫网络系统(内分泌调控为主), 但具体机制尚不明了。

mPR α 属于膜孕激素受体家族的一员, 相近的亚型还有 *mPR β* 和 *mPR γ* , 关于这 3 个亚型的研究报道相对比孕酮受体膜组分(PGRMC)多; 在国内仅见本课题组对半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)(史宝等, 2013)和条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)(史宝等, 2015)开展的膜孕激素受体 *mPR α* 通过下丘脑-垂体-性腺轴调控繁殖的研究。本研究探明了卵母细胞成熟过程

mPR α mRNA 的时序表达特征、*mPR α* 基因和蛋白在繁殖相关组织的定位分析, 但关于 *mPR α* 参与卵母细胞成熟、抑止细胞凋亡和调控激素分泌的机制、自身启动子和外源激素影响下 *mPR α* 基因转录调控机制以及 *mPR α* 真核表达产物及其促进卵母细胞成熟作用的研究尚不明了, 如何解析这些问题需今后更深入的探索。本研究为进一步研究膜孕激素受体的功能特征以及繁殖过程的生理作用奠定重要的理论基础。

参 考 文 献

- Berg AH, Thomas P, Olsson P. Biochemical characterization of the Arctic char (*Salvelinus alpinus*) ovarian progesterone membrane receptor. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2005, 3(1): 1-9
- Hanna R, Pang Y, Thomas P, *et al.* Cell-surface expression, progesterone binding, and rapid nongenomic signaling of zebrafish membrane progesterone receptors α and β in transfected cells. *Journal of Endocrinology*, 2006, 190(2): 247-260
- Kazeto Y, Goto-Kazeto R, Thomas P, *et al.* Molecular characterization of three forms of putative membrane-bound progesterone receptors and their tissue-distribution in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2005a, 34(3): 781-791
- Kazeto Y, Goto-Kazeto R, Trant JM. Membrane-bound progesterone receptors in channel catfish and zebrafish ovary: Changes in gene expression associated with the reproductive cycles and hormonal reagents. *General and Comparative Endocrinology*, 2005b, 142(1): 204-211
- Liu XZ, Shi B, Li XX, *et al.* Molecular characterization of the novel membrane progesterone receptor gene and its role during ovarian development in the half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(4): 608-619 [柳学周, 史宝, 李晓晓, 等. 半滑舌鲷新型膜孕激素受体基因分子特征及其在卵巢发育过程的作用. *中国水产科学*, 2015, 22(4): 608-619]
- Shi B, Li XX, Liu XZ, *et al.* Molecular cloning and tissue expression analysis of membrane progesterone receptor alpha gene(*mPR α*) from half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(3): 61-67 [史宝, 李晓晓, 柳学周, 等. 半滑舌鲷膜孕激素受体基因克隆与组织表达分析. *渔业科学进展*, 2013, 34(3): 61-67]

1) Li XX. Study on the physiological function of membrane progesterone receptor in the reproductive cycle of flatfish. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013, 1-73 [李晓晓. 膜孕激素受体在鲆鲽类繁殖周期中的生理功能研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 1-73]

- Shi B, Liu XZ, Chen SY, *et al.* Cloning and expression of membrane progesterin receptor (mPR α) in rock bream *oplegnathus fasciatus*. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2015, 46(3): 642–650 [史宝, 柳学周, 陈圣毅, 等. 条石鲷 mPR α 基因的 cDNA 克隆和表达模式分析. *海洋与湖沼*, 2015, 46(3): 642–650]
- Thomas P, Pang Y, Zhu Y, *et al.* Multiple rapid progesterin actions and progesterin membrane receptor subtypes in fish. *Steroids*, 2004, 69(8–9): 567–573
- Tokumoto M, Nagahama Y, Thomas P, *et al.* Cloning and identification of a membrane progesterin receptor in goldfish ovaries and evidence it is an intermediary in oocyte meiotic maturation. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 145(1): 101–108
- Tokumoto T. Identification of membrane progesterin receptors (mPR) in goldfish oocytes as a key mediator of steroid non-genomic action. *Steroids*, 2012, 77(10): 1013–1016
- Zhu Y, Rice CD, Pang Y, *et al.* Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is all intermediary in meiotic maturation of fish oocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2003, 100(5): 2231–2236

(编辑 冯小花)

The Expression Patterns of Membrane Progesterin Receptor α (mPR α) During Sexual Maturation in Female Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)

LI Xiaoni^{1,3}, LIU Xuezhou^{1,2,3}Ⓣ, SHI Bao^{1,2}, XU Yongjiang^{1,2}, LI Xiaoxiao^{1,2}, ZHANG Jinyong^{1,3}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. Dalian Ocean University, Dalian 110623)

Abstract In this study we collected the mature tissue samples of female Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* and investigated the expression patterns of mRNA and proteins of membrane progesterin receptor alpha (mPR α) in different tissues and different oocyte phases, using techniques such as quantitative real-time PCR, *in situ* hybridization, immunohistochemistry, and western blotting. It was shown that the highest level of mPR α mRNA appeared in the V phase of oocyte maturation. This further implied that mPR α was involved in the regulation of oocyte maturation through guiding progesterone. The western blotting analysis confirmed the expression of mPR α proteins in the ovary, brain, head kidney, kidney, and liver. Moreover, the expression of mPR α mRNA and proteins was higher in the brain and ovary than in other tissues. These results indicated that mPR α could play certain roles in different tissues, especially the endocrine-related ones. Results of *in situ* hybridization and immunohistochemistry clearly showed that the mPR α mRNA and proteins were expressed on the oocyte membrane and the bureaucratic structures of other organs. Our study enriched the knowledge about mechanisms of membrane receptor signal transduction.

Key words mPR α ; *Paralichthys olivaceus*; *in situ* hybridization; Immunohistochemistry; Western blotting; Expression pattern

Ⓣ Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

促性腺激素调控半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) 卵母细胞孕酮受体膜组分 1 的表达特征*

张金勇^{1,3} 柳学周^{1,2,3} 史宝^{1,2} 徐永江^{1,2}



(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 大连海洋大学 大连 116023)

摘要 采用 qRT-PCR 方法分析性成熟半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)不同发育时期卵巢卵母细胞的孕酮受体膜组分 1 (PGRMC1) mRNA 的表达, 研究发现, 在发育 IV 期的卵巢, 处于第 IV 时相的卵母细胞 PGRMC1 mRNA 表达量最高($P < 0.05$); 在发育 V 期的卵巢, 成熟期卵母细胞的 PGRMC1 mRNA 表达量最高($P < 0.05$)。采用不同浓度促性腺激素(HCG)处理卵巢发育 V 期半滑舌鳎不同时相的卵母细胞, 并通过 qRT-PCR 和 Western blotting 技术对其表达量变化进行检测。结果显示, 20 IU/ml HCG 对 PGRMC1 mRNA 和蛋白表达的调控作用比 10 IU/ml HCG 作用更明显, 表明 PGRMC1 mRNA 和蛋白表达对 HCG 调控作用存在剂量依存关系。HCG 对半滑舌鳎不同时相的卵母细胞的调控作用效果不同, 对第 V 时相卵母细胞作用最明显($P < 0.05$), 表明 PGRMC1 主要在卵母细胞成熟阶段发挥作用。PGRMC1 对 HCG 调控作用的正向应答效应预示其参与了卵母细胞成熟调控, 为进一步探讨 PGRMC1 在半滑舌鳎繁殖过程的功能提供重要基础资料。

关键词 半滑舌鳎; 孕酮受体膜组分 1 (PGRMC1) 基因; 卵母细胞; HCG 调控; 表达分析
中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0042-06

孕酮受体膜组分 1 (Progesterone receptor membrane component 1, PGRMC1) 是单次跨膜蛋白, 属于膜相关孕激素受体 (Membrane-associated progesterone receptor, MAPR) 家族。Meyer 等 (1996) 从猪肝实质细胞微粒体膜中提取并纯化了与孕激素高亲和力的 PGRMC1 蛋白。已有研究证明, PGRMC1 作为接头蛋白, 与配体分子共同参与调节与它结合的蛋白之间的相互作用和跨膜转运; 与孕激素结合, 介导调控孕激素信号通路 (Cahill, 2007; Lösel et al, 2008)。PGRMC1 mRNA 表达和定位在牛 (*Bovine*) (Dode et al, 2006)、大鼠 (*Rattus norvegicus*) (Peluso et al, 2006) 和人 (*Homo*

sapiens) 的卵母细胞 (Wood et al, 2007), 参与调控雌性配子发育和抑制卵母细胞凋亡。PGRMC1 在人和鼠等哺乳动物成熟过程中具有重要的调控作用 (Peluso et al, 2008)。

膜相关孕激素受体家族基因在鱼类中的相关研究并不多, 国外报道的有云纹犬牙石首鱼 (*Cynoscion nebulosus*) (Patiño et al, 1990)、条纹狼鲈 (*Morone saxatilis*) (King et al, 1997)、金鱼 (*Carassius auratus*) (Tokumoto et al, 2012)、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) (Kazeto et al, 2005) 和虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) (Yoshikuni et al, 1993) 等研究, 国内已报道的有半滑

* 国家自然科学基金项目 (31201982)、国家鲆鲽类产业技术体系 (CARS-50) 和山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目 (BS2013SW042) 共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31201982), China Agriculture Research System (CARS-50), and Shandong Youth Scientist Awards Foundation (BS2013SW042)] 张金勇, E-mail: jinyongzhang2013@126.com

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-08-05, 收修改稿日期: 2016-08-23

舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)的膜孕激素受体 mPR α (史宝等, 2013)和新型膜孕激素受体 mPRL(柳学周等, 2015), 条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)膜孕激素受体 mPR α (Shi *et al*, 2015)等; 该家族基因在鱼类生殖调控过程中具有重要的调控作用, 介导孕激素诱导卵母细胞成熟。尽管该家族中的 PGRMC1 研究的历史较长, 但关于其在鱼类卵母细胞发育成熟过程中的作用机制尚未明确, 仅见 PGRMC1 参与调控卵母细胞同步成熟、排卵的虹鳟卵巢发育的报道(Mourot *et al*, 2006)。

本实验室前期研究表明, PGRMC1 mRNA 在半滑舌鲷性成熟期时, 在与繁殖相关的脑、垂体和卵巢组织中表达丰富, 说明半滑舌鲷 PGRMC1 参与了卵母细胞的发育、成熟过程(张金勇等, 2016)。为了进一步了解半滑舌鲷下丘脑-垂体-性腺轴(HPG 轴)中 PGRMC1 对卵子发育成熟的作用机制, 本研究采用 qRT-PCR 和 Western blotting 技术分析体外培养条件下不同卵巢发育时期和不同发育时相的卵母细胞 PGRMC1 的表达特征, 为阐明 PGRMC1 参与调控半滑舌鲷卵母细胞成熟提供重要资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用半滑舌鲷取自山东烟台海阳市黄海水产有限公司, 挑取人工培育达到性成熟的 3 龄雌性亲鱼 21 尾, 全长为 52–59 cm, 体重为 1183.9–1349.2 g。实验用鱼的培育条件: 在室内水泥池中(5 m \times 5 m \times 1 m)全年开放流水培育, 水温为 10–25 $^{\circ}$ C, 盐度为 27–31, pH 为 7.8–8.4, 溶解氧为 5 mg/L 以上, 饲喂人工配合饲料。取样时, 使用质量浓度为 210 mg/L 的 MS-222 将亲鱼麻醉后解剖, 为了获得不同发育时相的卵母细胞, 选择性腺发育至 IV 期和 V 期的卵巢, 从卵巢中分离出不同发育时相的、未受损的卵母细胞(李晓晓, 2013)¹⁾, 用于体外培养, 分析不同时相卵母细胞 PGRMC1 的表达。

1.2 卵母细胞体外繁育

24 孔细胞培养板的每个孔放入 pH=7.6 的 1 ml DMEM 培养液(SIGMA)。剥离的卵母细胞样品用于促性腺激素(HCG)调控实验, 同时设置对照组。每孔放入 30 个卵母细胞, HCG 繁育浓度分别为 0、10 IU/ml

和 20 IU/ml, 共 3 个浓度组, 使用振荡培养箱 BSD-250(上海博迅)繁育卵母细胞, 24 $^{\circ}$ C 培养 6 h, 每 30 min 检查繁育情况, 观察卵母细胞发育进程。卵母细胞体外培养结束后, 分别将实验用卵母细胞在液氮速冻并转至–80 $^{\circ}$ C 冰箱存放, 用于 mRNA 和蛋白表达分析。

1.3 PGRMC1 的 qRT-PCR 检测

采用 TaKaRa 公司的 RNAiso Plus 抽提总 RNA 后, 按照 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒(TaKaRa)合成 cDNA 第一链, 用于基因表达分析。半滑舌鲷 PGRMC1 基因的实时定量引物参照 SYBR Premix Ex TaqTM II (TaKaRa)引物设计原则, 设计引物 RT-PGRMC1 F1(5'-GCTGAGTGG-GAGGCTCAGTT-3')和 RT-PGRMC1 R1(5'-TGTCC-TTTGCTTCCTCATCGT-3'), 以 18S rRNA 为内参基因, 引物分别为 18S F(5'-GGTCTGTGATGCCCTTAG ATGTC-3')和 18S R(5'-AGTGGGGTTCAGCGGGTT-AC-3')。使用 Mastercycler ep *realplex* Real-time PCR 仪(Eppendorf)和 SYBR Premix Ex TaqTM II (TaKaRa)荧光试剂, PCR 反应体系为 20 μ l: 上下游引物各 0.8 μ l, cDNA 模版 1 μ l, SYBR Premix Ex TaqTM II 10 μ l, 补充 ddH₂O 至 20 μ l。采用两步法, PCR 程序为 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 54.4 $^{\circ}$ C 20 s, 40 个循环。以 18S 作为内参基因来校正样品中 RNA 的量。程序运行完成后进行熔解曲线分析, 检验产物的特异性。实验样品设 3 个平行, 实验重复 3 次, 同时设阴性对照(模板以 ddH₂O 代替), 用以确认实验结果的可靠性。

1.4 PGRMC1 的 Western blotting 分析

使用动物组织蛋白提取试剂提取已收集的卵母细胞总蛋白, 取冻存在无酶 EP 管中的卵母细胞, 加入 0.5 ml 动物组织细胞裂解液, 使用无酶研磨棒充分匀浆, 冰浴中静置 30 min, 于 4 $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 即得到组织蛋白提取液。12% SDS-PAGE 电泳检测提取蛋白的质量, 并使用蛋白测定试剂盒测定组织总蛋白浓度。

将 40 μ g 总蛋白质进行 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 60 V 1 h, 然后 90 V 1.5 h。将分子量标准和凝胶上的蛋白电转移到 PVDF 膜上。1 \times PBST 洗涤 PVDF 膜 2 次(每次 5 min), 5%脱脂奶粉溶液室温封闭(1 \times PBST 稀释)1 h。洗涤, 加入由免疫新西兰大白兔

1) Li XX. Study on the physiological function of membrane progesterin receptor in the reproductive cycle of flatfish. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013, 1–73 [李晓晓. 膜孕激素受体在鲆鲽类繁殖周期中的生理功能研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 1–73]

制备的一抗与 5% BSA, 室温摇床 2 h, 一抗稀释 1:1500。二抗(联科生物公司)室温摇床 2 h, 稀释度为 1:2000。TBST 洗膜 2 次(每次 10 min), TBS 洗膜 1 次, 5 min。经二氨基联苯胺(DAB)显色, Nikon E80i 显微镜拍照, 蛋白灰度分析。

1.5 数据统计分析

利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法(Livak *et al*, 2001)处理 *PGRMC1* 基因的相对表达量数据。基因和蛋白表达数据使用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), Tukey's HSD 检验和 Duncan's 多重比较分析。相对表达量数据均以平均数±标准误(Mean±SE)表示, $P < 0.05$ 表示差异显著, AIC.AlphaView 成像分析系统(Cell Biosciences Inc)分析蛋白灰度, 并制成柱状图。

2 结果

2.1 卵子形成过程中 *PGRMC1* 的时序表达

采用 qRT-PCR 方法检测了半滑舌鳎不同发育期的卵巢中不同发育时相卵母细胞的 *PGRMC1* mRNA 的相对表达量(图 1)。结果显示, 在性腺发育为 IV 期和 V 期的卵巢中, 不同发育时相卵母细胞的 *PGRMC1* mRNA 的相对表达量随着卵母细胞的发育逐渐增高, 以 V 时相卵母细胞时达到峰值, VI 时相时又降为较低水平($P < 0.05$)。同时, 比较 IV 期和 V 期卵巢中的 V 时相卵母细胞的 *PGRMC1* mRNA 表达量可看出, 以进入成熟期的 V 期卵巢中的 V 时相卵母细胞的 *PGRMC1* mRNA 表达量最高($P < 0.05$), 表明此时的卵母细胞进

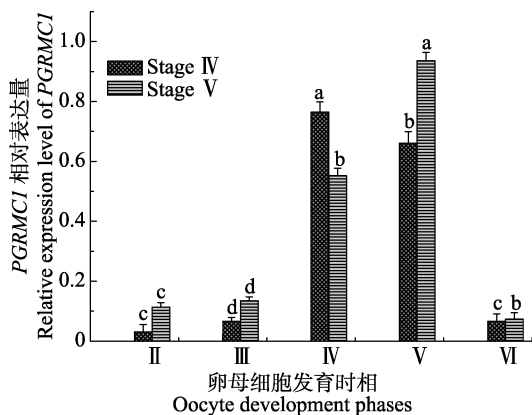


图 1 半滑舌鳎卵巢 IV 和 V 期中卵母细胞不同时相 *PGRMC1* mRNA 的表达水平

Fig.1 The relative expression levels of *PGRMC1* mRNA at different oocyte phases in different development stages of *C. semilaervis*

不同字母间差异显著($P < 0.05$), 下同
Different letters represent significant difference ($P < 0.05$), the same as below

入成熟期, 此阶段 *PGRMC1* 基因的生理学作用效果最明显, 预示 *PGRMC1* 基因在卵母细胞成熟过程中起着重要的调控作用。

2.2 HCG 对不同时相卵母细胞 *PGRMC1* 表达的调控作用

使用 HCG 孵育半滑舌鳎 V 期卵巢中不同时相的卵母细胞 6 h 后, 采用 qRT-PCR 方法检测其 *PGRMC1* 基因的表达变化。由图 2 得知, 10 IU/ml 和 20 IU/ml 剂量的 HCG 对半滑舌鳎卵母细胞中 *PGRMC1* 基因表达都有一定的促进作用, 均高于对照组; 不同发育时相卵母细胞的 *PGRMC1* mRNA 的相对表达量随着卵母细胞的发育逐渐增高, 第 V 时相卵母细胞时达到峰值, 第 VI 时相时又降为较低水平($P < 0.05$); 特别是对即将进入成熟阶段卵母细胞中 *PGRMC1* 基因的表达量提升明显($P < 0.05$), 表明 HCG 通过 *PGRMC1* 提升了卵母细胞的减数分裂成熟能力。研究结果预示, *PGRMC1* 和卵母细胞成熟存在密切关系。此外, 20 IU/ml 剂量的 HCG 对 *PGRMC1* 基因表达的调控作用比剂量为 10 IU/ml HCG 作用更明显, 表明 *PGRMC1* 基因表达对 HCG 调控作用存在剂量依存关系。

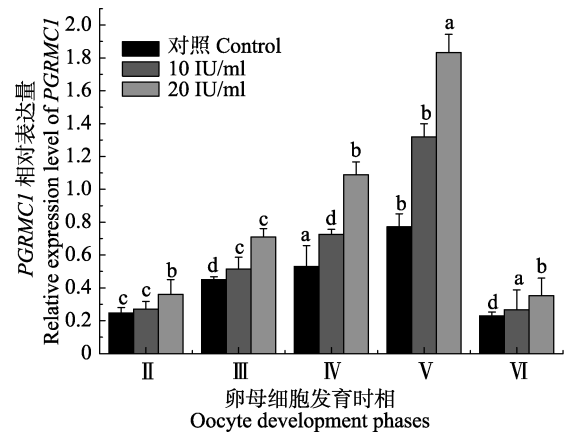


图 2 半滑舌鳎不同发育时相卵母细胞在不同浓度 HCG 调控下 *PGRMC1* mRNA 的表达水平
Fig.2 Effects of HCG at different concentrations on *PGRMC1* mRNA expression in different oocyte phases of *C. semilaervis*

采用 Western blotting 方法检测了半滑舌鳎 *PGRMC1* 蛋白的表达情况(图 3), 结果显示, 检测到清晰蛋白条带, 分子量大约为 21 kDa, 与预测的蛋白分子量 20.64 kDa 相当(图 3-A)(张金勇等, 2017, 待发表)。终浓度为 10 IU/ml 和 20 IU/ml HCG 处理组对各时相卵母细胞 *PGRMC1* 蛋白表达的促进作用明显, 均高于对照组; 不同发育时相卵母细胞的 *PGRMC1* 蛋白表达量随卵母细胞发育逐渐增高, 第 V 时相卵母细胞时达到

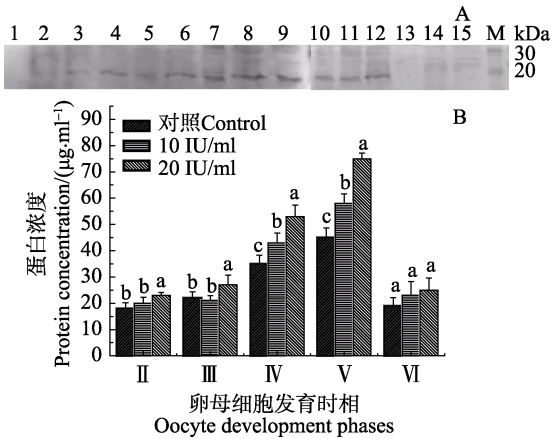


图 3 不同浓度 HCG 对半滑舌鳎不同时期卵母细胞 PGRMC1 蛋白表达量的影响

Fig.3 Effects of HCG at different concentrations on PGRMC1 protein expression in different oocyte phases of *C. semilaevis*

A: PGRMC1 蛋白表达量电泳;

B: PGRMC1 蛋白表达量量化丰度

A 图中的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 和 13、14、15 各条带组分别对应 B 图中 II 时相、III 时相、IV 时相、V 时相、VI 时相的卵母细胞; M 为蛋白分子量标准

A: Electrophoretogram of PGRMC1 protein expression;
B: Quantitative abundance of PGRMC1 protein expression
Digit 1, 2, and 3; 4, 5, and 6; 7, 8, and 9; 10, 11, and 12;
13, 14, and 15 in figure A corresponded to II, III, IV,
V, VI groups in figure B, respectively; M: Protein
molecular weight marker

峰值, 第 VI 时相时又降为较低水平 ($P < 0.05$), 且 PGRMC1 蛋白表达与 HCG 调控作用存在剂量依存关系。结果显示, HCG 在调控卵母细胞成熟过程中, PGRMC1 蛋白表达规律与 PGRMC1 基因的表达规律相似。

3 讨论

膜孕激素受体家族包括孕激素膜受体(mPRs)和孕酮受体膜组分(PGRMCs)两类受体, 其中, 膜孕激素受体有 3 个亚型, 即 mPR α 、mPR β 和 mPR γ ; 孕酮受体膜组分有 2 种亚型, 即 PGRMC1 和 PGRMC2。本实验室前期研究已克隆得到半滑舌鳎 PGRMC1 基因全长序列, 分析了 PGRMC1 mRNA 在性成熟雌性半滑舌鳎卵巢不同发育时期的表达特征, 发现在卵巢中 PGRMC1 mRNA 表达水平随卵巢发育逐步上升, V 期时达到最高值 ($P < 0.05$) (张金勇等, 2016)。Preechaphol 等 (2010) 报道, 眼柄摘除的斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 的不同发育阶段的卵巢中 PGRMC1 mRNA 的表达均高于对照组, 说明 PGRMC1 参与斑节对虾的卵母细胞发育成熟的调控。尽管半滑舌鳎和斑节对

虾处于不同进化地位, 但半滑舌鳎和斑节对虾 PGRMC1 mRNA 在卵巢组织表达规律和生理作用上表现出相似性, 这表明适当形式的孕激素有可能通过 PGRMC1 诱发卵母细胞发育和成熟。本研究中, 半滑舌鳎卵巢发育至 IV 期时, PGRMC1 mRNA 在第 IV 时相的卵母细胞中表达量最高; 在卵巢发育至 V 期时, PGRMC1 mRNA 表达的最高值出现在第 V 时相的卵母细胞中。由此看来, PGRMC1 对半滑舌鳎卵母细胞发育、成熟起重要的调控作用, 卵母细胞的最终成熟以及排卵等过程的完成可能需要大量 PGMRC1 的参与。

鱼类卵母细胞成熟是一个由多因子调控的复杂生理过程, 卵母细胞减数分裂起始于胚胎期, 最后发育成为可受精的卵细胞(邓晓惠, 2004)。采用 HCG 分别孵育金鱼和大西洋绒须石首鱼 (*Micropogonias undulatus*) 的卵母细胞, mPR α 蛋白水平升高; 上调的卵母细胞 mPR α 蛋白水平与卵母细胞成熟相关(Zhu *et al*, 2003; Tokumoto *et al*, 2006)。PGRMC1 和 mPR α 同为膜孕激素受体家族成员, 它们在不同鱼类类似的表达模式预示着在卵巢发育成熟过程中很可能都具有重要的生理功能。本研究通过不同浓度 HCG 处理半滑舌鳎卵巢成熟期的不同时期相的卵母细胞, 发现半滑舌鳎卵母细胞 PGRMC1 蛋白和 mRNA 对 HCG 的调控正向应答; PGRMC1 蛋白和 mRNA 表达量的提高, 可能增强了半滑舌鳎卵母细胞对孕激素的应答能力, 提高了卵母细胞减数分裂成熟能力。柳学周等(2015、2014)发现, 雌性半滑舌鳎血清中促黄体激素(LH)和孕激素的浓度在卵巢成熟过程中逐渐升高, 并在 V 期卵巢达到最高值; 这两种激素变化规律与当前研究中 PGRMC1 蛋白和 mRNA 在卵母细胞表达变化趋势相吻合, 表明半滑舌鳎脑垂体分泌的 LH 作用于 HPG 轴, 促使卵巢分泌孕激素, PGRMC1 介导孕激素诱导卵母细胞成熟。半滑舌鳎为卵巢发育非同步、分批产卵的鲆鲽类, 本研究中 PGRMC1 蛋白和 mRNA 在不同时期相卵母细胞中均检测到表达, 这也说明 PGRMC1 可以介导孕激素维持卵母细胞发育和抗凋亡, 这与人类 PGRMC1 具有抑制卵巢早衰的生理功能相一致(Mansouri *et al*, 2008)。

本研究探明了卵母细胞成熟过程中 PGRMC1 mRNA 的时序表达特征, 解析了促性腺激素调控不同发育时期卵母细胞 PGRMC1 蛋白和 mRNA 的表达规律, 但关于 PGRMC1 参与信号传导通路以及 PGRMC1 真核表达产物及其促进卵母细胞成熟作用的更深入机

制尚不明了, 这些问题需今后更深入的探索。

参 考 文 献

- Cahill MA. Progesterone receptor membrane component 1: An integrative review. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 105(1–5): 16–36
- Deng XH. Technology and color atlas of reproductive medical science. Jinan: Shandong Science and Technology Press, 2004, 93–94 [邓晓惠. 生殖医学技术及彩色图谱. 济南: 山东科学技术出版社, 2004, 93–94]
- Dode MAN, Dufort I, Massicotte L, *et al.* Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 2006, 73(3): 288–297
- Kazeto Y, Goto-Kazeto R, Thomas P, *et al.* Molecular characterization of three forms of putative membrane-bound progesterone receptors and their tissue-distribution in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2005, 34(3): 781–791
- King W 5th, Ghosh S, Thomas P, *et al.* A receptor for the oocyte maturation-inducing hormone 17 α , 20 β , 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one on ovarian membranes of striped bass. *Biology of Reproduction*, 1997, 56(1): 266–271
- Liu XZ, Shi B, Li XX, *et al.* Molecular characterization of the novel membrane progesterone receptor gene and its role during ovarian development in the half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(4): 608–619 [柳学周, 史宝, 李晓晓, 等. 半滑舌鲷新型膜孕激素受体基因分子特征及其在卵巢发育过程的作用. *中国水产科学*, 2015, 22(4): 608–619]
- Liu XZ, Shi B, Wang SS, *et al.* Full length cDNA cloning and expression of luteinizing hormone (LH) and which serum concentration was measured in half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Engineering Science*, 2014, 16(9): 50–60 [柳学周, 史宝, 王珊珊, 等. 半滑舌鲷促黄体激素基因克隆和表达分析及其血清浓度测定. *中国工程科学*, 2014, 16(9): 50–60]
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- Lösel RM, Besong D, Peluso JJ, *et al.* Progesterone receptor membrane component 1—Many tasks for a versatile protein. *Steroids*, 2008, 73(9–10): 929–934
- Mansouri MR, Schuster J, Badhai J, *et al.* Alterations in the expression, structure and function of progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) in premature ovarian failure. *Human Molecular Genetics*, 2008, 17(23): 3776–3783
- Meyer C, Schmid R, Scriba PC, *et al.* Purification and partial sequencing of high-affinity progesterone-binding site(s) from porcine liver membranes. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 239(3): 726–731
- Mourot B, Nguyen T, Fostier A, *et al.* Two unrelated putative membrane bound progesterone receptors, progesterone membrane receptor component 1 (PGRMC1) and membrane progesterone receptor (mPR) beta, are expressed in the rainbow trout oocyte and exhibit similar ovarian expression patterns. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2006, 4(1): 1–14
- Patiño R, Thomas P. Characterization of membrane receptor activity for 17 alpha, 20 beta, 21-trihydroxy-4-pregnen- 3-one in ovaries of spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*). *General and Comparative Endocrinology*, 1990, 78(2): 204–217
- Peluso JJ, Pappalardo A, Losel R, *et al.* Progesterone membrane receptor component 1 expression in the immature rat ovary and its role in mediating progesterone's antiapoptotic action. *Endocrinology*, 2006, 147(6): 3133–3140
- Peluso JJ, Romak J, Liu X. Progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) is the mediator of progesterone's antiapoptotic action in spontaneously immortalized granulosa cells as revealed by PGRMC1 small interfering ribonucleic acid treatment and functional analysis of PGRMC1 mutations. *Endocrinology*, 2008, 149(2): 534–543
- Preechaphol R, Klinbunga S, Yamano K, *et al.* Molecular cloning and expression of progesterone membrane receptor component 1 (PGRMC1) of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 168(3): 440–449
- Shi B, Li XX, Liu XZ, *et al.* Molecular cloning and tissue expression analysis of membrane progesterone receptor alpha gene (mPR α) from half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(3): 61–67 [史宝, 李晓晓, 柳学周 等. 半滑舌鲷膜孕激素受体基因克隆与组织表达分析. *渔业科学进展*, 2013, 34(3): 61–67]
- Shi B, Liu XZ, Xu YJ, *et al.* Molecular and transcriptional characterization of GTHs and mPR α during ovarian maturation in rock bream *Oplegnathus fasciatus*. *Journal of Experimental Zoology, Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 2015, 323(4): 430–444
- Tokumoto T. Identification of membrane progesterone receptors (mPR) in goldfish oocytes as a key mediator of steroid non-genomic action. *Steroids*, 2012, 77(10): 1013–1016
- Tokumoto M, Nagahama Y, Thomas P, *et al.* Cloning and identification of a membrane progesterone receptor in goldfish ovaries and evidence it is an intermediary in oocyte meiotic maturation. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 145(1): 101–108
- Wood JR, Dumesic DA, Abbott DH, *et al.* Molecular abnormalities in oocytes from women with polycystic ovary syndrome revealed by microarray analysis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2007, 92(2): 705–713
- Yoshikuni M, Shibata N, Nagahama Y. Specific binding of [³H] 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one to oocyte cortices of

rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 1993, 11(1–6): 15–24

Zhang JY, Liu XZ, Shi B, *et al.* Molecular cloning, tissue and spatio-temporal expression pattern of PGRMC1 in the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(5): 1080–1090[张金勇, 柳学周, 史宝, 等. 半滑舌鳎孕酮受体膜组分 1 基因

的克隆及组织和时空表达规律. *中国水产科学*, 2016, 23(5): 1080–1090]

Zhu Y, Rice CD, Pang Y, *et al.* Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2003, 100(5): 2231–2236

(编辑 冯小花)

HCG Regulation of PGRMC1 Expression in the Oocyte of Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)

ZHANG Jinyong^{1,3}, LIU Xuezhou^{1,2,3}Ⓣ, SHI Bao^{1,2}, XU Yongjiang^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. Dalian Ocean University, Dalian 116023)

Abstract In this study we investigated the characteristics and mechanisms of the expression of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) during oocyte maturation of the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Expression of *PGRMC1* mRNA in the oogenesis of the ovarian development stages IV and V were monitored with qRT-PCR technique. The results showed that the highest level of *PGRMC1* mRNA appeared in Phase V oocytes of the mature *C. semilaevis*. In general, the transcription of *PGRMC1* peaked in different developmental phases of oocyte. This suggested that PGRMC1 participated in ovarian development and maturation of *C. semilaevis*. Next we tested whether HCG treatment affected PGRMC1 expression in different stages of oogenesis using qRT-PCR and western blotting analysis. It was shown that HCG could up-regulate the expression of PGRMC1 mRNA and protein, and that 20 IU/ml HCG was more powerful than 10 IU/ml ($P < 0.05$). The effect of HCG varied in different phases of oocyte and was the most obvious in Phase V, indicating that PGRMC1 played an important role in the mature stage. The results above suggested that PGRMC1 could regulate the maturation of *C. semilaevis* oocytes. Our findings may shed light on future exploration of the role of PGRMC1 in the reproductive function of *C. semilaevis*.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; PGRMC1 gene; Oocyte maturation; HCG regulation; Expression analysis

Ⓣ Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

孕酮受体膜组分 1 基因在性成熟雌性 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)的 组织学定位定量分析*



张金勇^{1,3} 史宝^{1,2} 柳学周^{1,2,3} 徐永江^{1,2}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业
科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 大连海洋大学 大连 116023)

摘要 运用 Western blotting、免疫组化和原位杂交方法检测性成熟半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)孕酮受体膜组分 1 (Progesterone receptor membrane component 1, PGRMC1)蛋白和 mRNA 在不同组织的分布和表达特征。原位杂交结果发现, PGRMC1 mRNA 主要分布在成熟的卵母细胞膜上,在脑组织神经元和分散的垂体细胞中也有表达。利用制备的半滑舌鲷 PGRMC1 多克隆抗体,对不同组织中的 PGRMC1 蛋白表达量进行 Western blotting 检测,发现在半滑舌鲷卵巢、脑、肝脏中 PGRMC1 蛋白表达量相对较高,在垂体、头肾、肾也有表达,但表达量相对较少。免疫组化结果表明,半滑舌鲷 PGRMC1 蛋白在成熟的卵母细胞膜上显著表达,进一步证明 PGRMC1 为卵膜上的受体基因,推测其主要在卵膜上行使相关的生理功能。研究结果为探究 PGRMC1 在半滑舌鲷卵母细胞成熟过程中的生理功能提供了重要参考。

关键词 半滑舌鲷; 孕酮受体膜组分 1; 卵母细胞成熟; 表达分析

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0048-08

孕酮受体膜组分 1 (Progesterone receptor membrane component 1, PGRMC1)为广泛存在于真核生物中的膜相关的孕激素受体蛋白 (Membrane-associated progesterone receptor protein, MAPR)家族中的一员。PGRMC1 以多肽单体的形式存在,为二聚体或低聚体,这些存在形式均可以介导孕激素快速反应性,引起膜相关信号传导(张颖等, 2013)。研究发现,在不同的环境条件下 PGRMC1 能改变它的亚细胞定位,参与不同的细胞调控活动;与 PGRMC1 蛋白的多亚细胞定位特点对应的是 PGRMC1 能与不同的蛋白结合,通过不同的配基相互作用发挥不同的生物学功能

(Lösel *et al.*, 2008)。已有研究表明, PGRMC1 在参与大鼠(*Rattus norvegicus*)和人(*Homo sapiens*)颗粒/黄体细胞胆固醇代谢和类固醇生物合成(Hughes *et al.*, 2007; Suchanek *et al.*, 2005)、基因转录(Peluso *et al.*, 2012)、介导孕激素在卵巢细胞中的抗凋亡活动(Mansouri *et al.*, 2008)、诱导卵母细胞成熟(Peluso *et al.*, 2008)、促进体外卵巢细胞的存活(Luciano *et al.*, 2008)、细胞分裂(Luciano *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2009)和精子顶体反应(Bryan *et al.*, 2015)等方面有重要的调控作用。

目前,在鱼类中关于 PGRMC1 的相关研究较少,仅在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(Mourot *et al.*, 2006)、

* 国家自然科学基金项目(31201982)、山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2013SW042)和国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50)共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31201982), Shandong Youth Scientist Awards Foundation (BS2013SW042) and China Agriculture Research System (CARS-50)] 张金勇, E-mail: jinyongzhang2013@126.com

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-07-22, 收修改稿日期: 2016-09-19

斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)(徐驰, 2011)¹⁾、海七鳃鳗(*Petromyzon marinus*)(Bryan *et al.*, 2015)有过报道。PGRMC1 在鲆鲽类中的繁殖调控作用机制尚不清楚, 相关研究亟待开展。本实验室前期实验初步研究了半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*) PGRMC1 基因结构及表达特征(张金勇等, 2016), 本研究采用原位杂交、免疫组化技术和 Western blotting 等方法研究了半滑舌鲷 PGRMC1 基因在半滑舌鲷不同组织中的细胞学定位和表达特征, 为探明 PGRMC1 的生理功能, 特别是在下丘脑-垂体-性腺轴(HPG 轴)和卵母细胞成熟过程中所参与的调控作用提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用半滑舌鲷取自山东烟台黄海水产有限公司。挑取人工培育达到性成熟 3 龄雌性亲鱼 21 尾。所用亲鱼全长为 52–59 cm, 体重为 1183.9–1349.2 g。实验用鱼的培育条件: 在室内水泥池中(5 m×5 m×1 m)全年开放流水培育, 饲喂人工配合饲料, 水温为 10–25℃, 盐度为 27–31, pH 7.8–8.4, 溶解氧为 5 mg/L 以上。使用 MS-222 麻醉亲鱼后解剖, 留取脑、垂体、性腺、肾等各组织样品, 4%多聚甲醛[溶于 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)中]在 4℃条件下固定 20 h, 梯度甲醇脱水, -20℃保存在甲醇中的样品, 一部分用于免疫组化, 一部分样品用于原位杂交; 液氮速冻后转至-80℃保存各组织样品, 用于总蛋白的提取。

1.2 PGRMC1/pBST-18 质粒构建和探针制备

根据所得半滑舌鲷 PGRMC1 的 cDNA 序列全长, 设计扩增产物为 280 bp 的原位杂交探针引物, PGRMC1-ISH-F(5'-AAGCTTCCGAGGAAAGCGAAGTAC-3')和 PGRMC1-ISH-R(5'-GAATTCATAAACT-TCTTCCCCCG-3'), 构建重组质粒(PGRMC1/pBST-18, Roche)作为模板制备地高辛标记的 RNA 探针, 将扩增后的阳性菌落提取的质粒分别用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Eco*R I 酶切, 使其线性化, 按照 Roche 公司的 DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)试剂盒说明书, 分别用 SP6、T7 转录酶进行体外转录, 反应体系为 10 μl: 线性化质粒 DNA 4 μg, DIG-UTP Mixture 1 μl, 10×Buffer 1 μl, 反转录酶 1 μl, RNA 酶抑制剂 1 μl, 合成地高辛标记的正、反义 RNA 探针。合成的 RNA

探针用 1%琼脂糖电泳和紫外分光光度计鉴定检测。

1.3 切片原位杂交分析

将处理好的原位杂交切片在烘箱 37℃烘 3 h 后进行切片原位杂交, 二甲苯脱蜡处理 3 次(每次 5 min), 乙醇梯度脱水(100%乙醇 2 次, 每次 10 min; 95%、70%、50%乙醇各 1 次, 每次 5 min)。4% PFA-PBS 固定 10 min。PBS 冲洗 3 次, 每次 10 min。0.2 mol/L 的 HCl 处理 10 min。PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。10 μg/ml 蛋白酶 K 消化 10 min。PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。加入含 tRNA 和肝素预杂交液, 70℃预杂交 8 h, 再加入反义 RNA 探针 200 ng 的杂交液, 70℃过夜。50%无 tRNA 及肝素的预杂交液和 50% 2×SSC, 70℃放置 15 min; 0.2×SSC, 70℃放置 1 h。1×MAB 室温 5 min。含 10%山羊血清的封闭液室温封闭 6 h。1:500 稀释的碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体, 4℃孵育过夜。PBST 室温冲洗 6 次, 每次 15 min; 碱性磷酸缓冲液室温 2 次, 每次 10 min。加 200 μl BCIP/NBT 底物溶液, 置黑暗处显色, 观察颜色变化。待显色达到理想着色后, PBST 洗涤 5 次, 每次 5 min, 终止反应, 4% PFA-PBS 固定 10 min, PBST 洗 3 次, 每次 5 min; 酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 封片, 拍照。

1.4 Western blotting

取冻存的半滑舌鲷脑、垂体、卵巢等组织(约 100 mg), 加入 1 ml 动物组织蛋白提取试剂, 匀浆器充分匀浆、冰浴静置 30 min, 于 4℃、12000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 即得到组织蛋白提取液。12% SDS-PAGE 电泳检测提取蛋白的质量, 并使用蛋白测定试剂盒测定组织总蛋白浓度。

分析半滑舌鲷 PGRMC1 蛋白序列选择抗原表位, 制备抗体。统一蛋白上样量为 40 μg, 12% SDS-PAGE 胶蛋白电泳, 60 V 1 h, 然后 90 V 1.5 h; 经转膜、PVDF 膜活化, 按阳极-滤纸-PVDF 膜-凝胶-滤纸-阴极的顺序放入半干式转膜仪, 400 mA 25 min 将分子量标准和凝胶上的蛋白电转移到 PVDF 膜上; 1×PBST 洗涤 PVDF 膜 2 次, 每次 5 min, 5%脱脂奶粉溶液封闭(1×PBST 稀释)室温 3 h; 洗涤; 加一抗(半滑舌鲷 PGRMC1 多克隆抗体)与 5% BSA 室温摇床 2 h, 一抗稀释 1:1500 (1×PBST 稀释); 二抗(羊抗兔 IgG 抗体)室温摇床 2 h, 稀释度为 1:2000 (1×PBST 稀释)。DAB 显色, Nikon E80i 显微镜拍照, 蛋白灰

1) Xu C. *mPRA* and *PGRMC1*: cDNAs cloning and expression profiles in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. Master's Thesis of Sun Yat-sen University, 2011 [徐驰. 斜带石斑鱼 *mPRA* 和 *PGRMC1* 基因 cDNA 的克隆及表达模式分析. 中山大学硕士研究生学位论文, 2011]

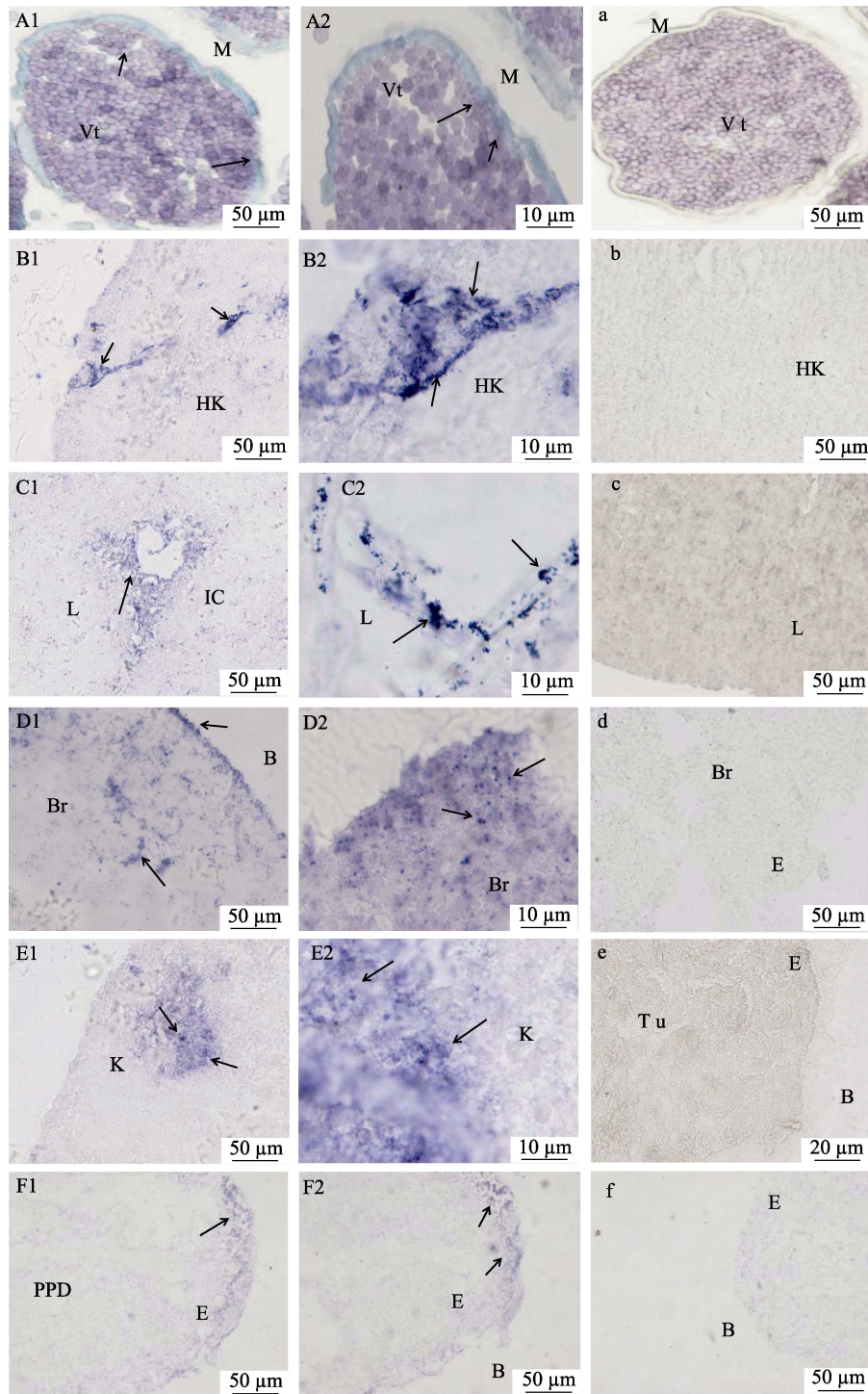


图 1 半滑舌鳎 *PGRMC1* 在不同组织中的定位

Fig.1 Location of *PGRMC1* gene in different tissues of *C. semilaevis*

A1: 卵巢; B1: 头肾; C1: 肝脏; D1: 脑; E1: 肾; F1: 垂体; A2、B2、C2、D2 和 E2 分别为卵巢、头肾、肝脏、脑和肾放大 1000 倍, F2 为垂体放大 200 倍; a、b、c、d、e 和 f: 卵巢、头肾、肝脏、脑、肾和垂体的阴性对照组

TU: 肾小管; K: 肾脏细胞; Vt: 卵黄; E: 组织边缘; L: 肝脏细胞; B: 空白区; Br: 脑细胞;

HK: 头肾细胞; M: 卵母细胞膜; P: 垂体细胞; PPD: 外周部位

A1: Ovary; B1: Head-kidney; C1: Liver; D1: Brain; E1: Kidney; F1: Pituitary; A2, B2, C2, D2 and E2: Ovary, head-kidney, liver, brain, and kidney ($\times 1000$); F2: Pituitary ($\times 200$); a, b, c, d, e, and f:

Negative control of ovary, head-kidney, liver, brain, kidney, and pituitary

TU: Tubules; K: Kidney; Vt: Vitellogenic oocytes; E: Edge of tissues; L: Liver; B: Blank; Br: Brain cell; HK: Head-kidney cell; M: Oocyte membrane; PPD: Proximal part distalis

度分析。同时采用空白对照检测多克隆抗体的特异性。

1.5 免疫组化

取 100% 甲醇中保存的样品, 使用常规切片制备方法获取免疫组化切片, 免疫组化实验过程: 二甲苯脱蜡 2 次, 每次 5 min; 梯度乙醇复水 3 min; 1×PBST 洗涤; 3% H₂O₂ 封闭内源酶, 室温孵育 15 min; PBST 洗涤; 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液修复抗原, 微波炉加热沸腾后, 中低档保持 95℃ 20 min, 自然冷却至室温; PBST 洗涤; 5% BSA 封闭(溶于 1×PBST)室温摇床 2 h; 半滑舌鳎 PGRMC1 抗体(1:1000)稀释, 使其完全覆盖组织切片, 湿盒中室温过夜; PBST 洗涤; 二抗使用羊抗兔 IgG 抗体(1:1000 稀释), 湿盒中室温 1 h; PBST 洗涤; DAB 显色; PBST 洗涤; 苏木精染液复染 3-5 min; 0.1% HCl 分化复蓝后立即自来水冲洗; 梯度乙醇脱水; 二甲苯透明 2 min; 封片; Nikon E80i 显微镜拍照。阴性对照组采用 1×PBS 代替一抗, 孵育方法相同。

1.6 统计分析

蛋白表达数据使用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)检验和 Duncan's 多重比较分析。相对表达量数据均以平均数±标准误(Mean±SE)表示, 当 $P < 0.05$ 时表示差异显著, AIC.AlphaView 成像分析系统(Cell Biosciences Inc)分析蛋白灰度, 并制成柱状图。

2 结果

2.1 PGRMC1 基因的细胞学定位

原位杂交分析 PGRMC1 mRNA 在繁殖相关组织中的细胞学定位见图 1。图 1-A1 显示, 在成熟卵巢组织中, PGRMC1 mRNA 在卵母细胞膜上显著性表达, 图 1-A2 为放大 1000 倍表达结果, 明显看出在卵母细胞膜上的阳性信号。图 1-B1 显示在头肾组织中, PGRMC1 mRNA 的表达在组织外周的显色更显著, 并向内管道式延伸, 图 1-B2 为放大 1000 倍结果, 明显显示 PGRMC1 mRNA 表达部位并向内管道式延伸。图 1-C1 显示肝脏 PGRMC1 mRNA 主要定位在胆小管周围, 图 1-C2 为放大 1000 倍结果。图 1-D1 显示, 在脑组织中, PGRMC1 mRNA 主要定位在外周部位, 图 1-D2 为部分放大区域。图 1-E1 及放大 1000 倍的图 1-E2 显示, PGRMC1 mRNA 在肾小管区域显色信号丰富。图 1-F1 和图 1-F2 显示, 在垂体组织中, PGRMC1 mRNA 阳性信号分布于分散的垂体细胞中。

2.2 PGRMC1 蛋白表达量

半滑舌鳎 PGRMC1 蛋白在不同组织表达水平的结果显示, 在卵巢、脑、垂体、肝脏、头肾和肾脏组织检测到蛋白条带, 分子量约为 21 kDa, 与预测的蛋白分子量 20.64 kDa 相当(图 2-A)。对照组采用多肽抗原进行 Western blotting, 证实了抗体特异性。半滑舌鳎 PGRMC1 蛋白表达量在卵巢、脑、肝脏中相对较高, 在肾脏、垂体、头肾组织中也有表达, 但表达量相对较少(图 2-B)。基于 PGRMC1 蛋白在卵巢、脑和肝脏等组织中的较高水平表达, 说明 PGRMC1 在半滑舌鳎多种组织中参与调节孕激素生理功能。

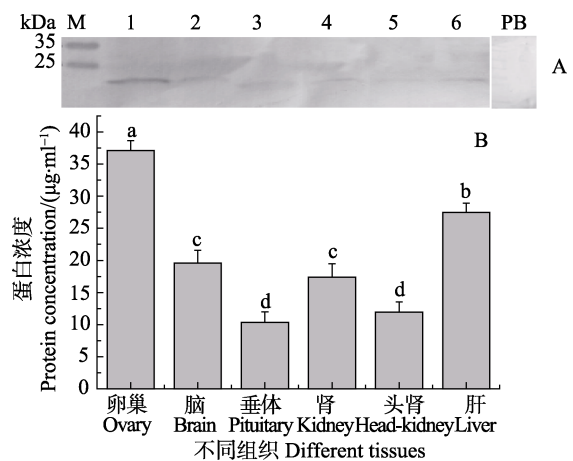


图 2 半滑舌鳎各组织 PGRMC1 蛋白表达量
Fig.2 Expression of PGRMC1 protein in the tissues of *C. semilaevis*

A: PGRMC1 蛋白表达电泳; B: PGRMC1 蛋白表达量量化丰度

1: 卵巢; 2: 脑; 3: 垂体; 4: 肾; 5: 头肾; 6: 肝;

M: 蛋白分子量标准; PB: 阴性对照

不同字母间差异显著($P < 0.05$)

A: Electrophoregram of PGRMC1 protein expression;

B: Protein expression abundance for PGRMC1

1: Ovary; 2: Brain; 3: Pituitary; 4: Kidney; 5: Head-kidney; 6: Liver; M: Protein molecular weight marker; PB: Negative control
Different letters represent significant difference ($P < 0.05$)

2.3 PGRMC1 蛋白的细胞学定位

免疫组化结果表明, 半滑舌鳎 PGRMC1 在卵巢、脑和垂体的细胞学定位与原位杂交实验结果基本一致(图 3)。PGRMC1 在性成熟半滑舌鳎不同组织中的分布强度见表 1。图 3-A1 结果显示, 在性成熟卵巢组织中, PGRMC1 主要在卵母细胞膜上表达丰富, 放大 1000 倍的图 3-A2 可以很明显地看出其在膜附近的表达。图 3-B1 结果显示, 头肾的表达部位主要在外周组织, 放大 1000 倍的图 3-B2 可以很明显地看出其在外周部位的表达。图 3-C1 显示肝脏 PGRMC1 主要定位在肝静脉周围显色, 放大 1000 倍的图 3-C2 可

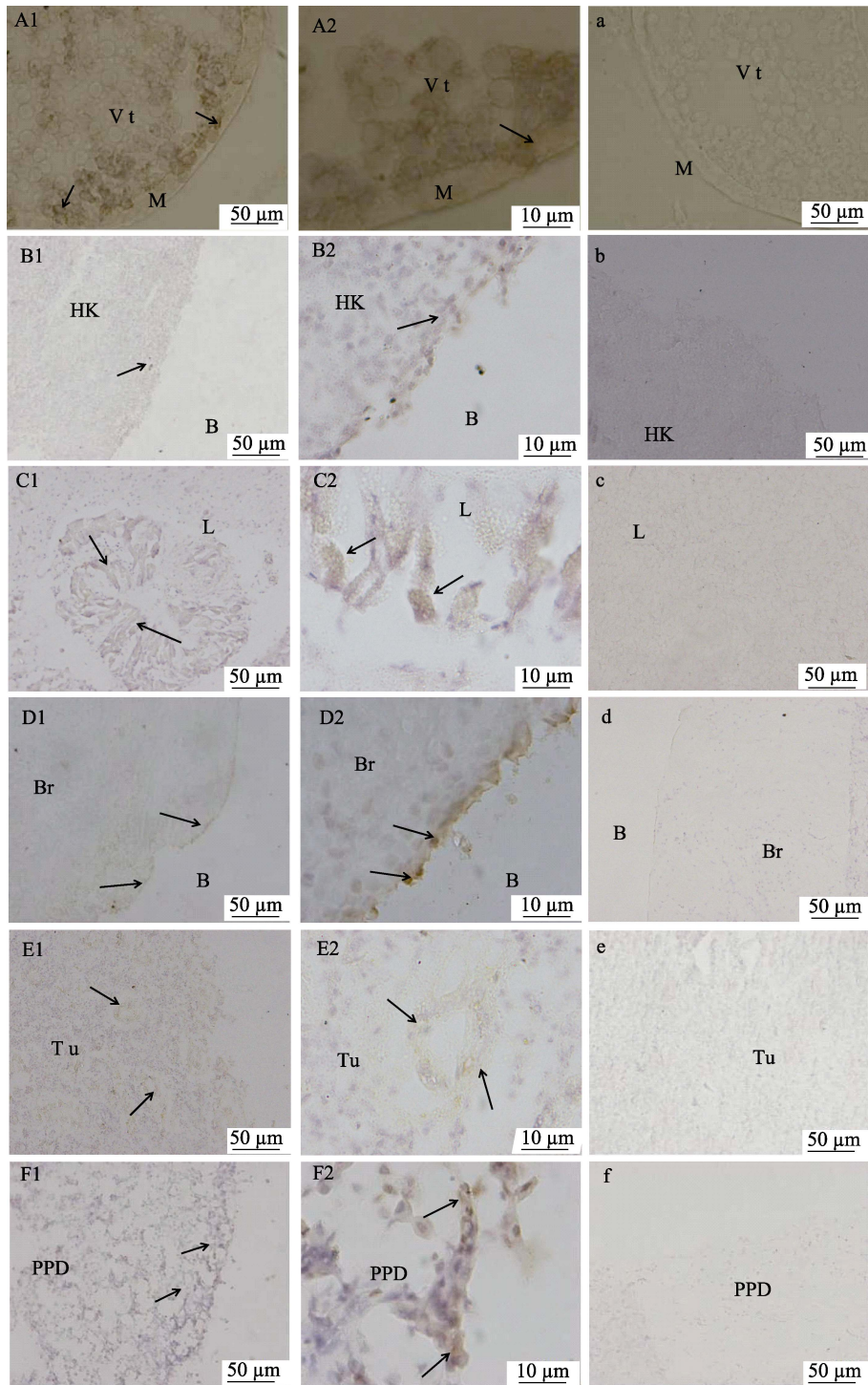


图 3 半滑舌鳎 PGRMC1 蛋白在不同组织中的分布

Fig.3 Location of PGRMC1 protein in different tissues of *C. semilaevis*

A1: 卵巢; B1: 头肾; C1: 肝脏; D1: 脑; E1: 肾; F1: 垂体; A2、B2、C2、D2、E2 和 F2: 卵巢、头肾、肝脏、

脑、肾和垂体放大 1000 倍; a、b、c、d、e 和 f: 卵巢、头肾、肝脏、脑、肾和垂体的阴性对照组

TU: 肾小管; K: 肾脏细胞; Vt: 卵黄; E: 组织边缘; L: 肝脏细胞; B: 空白区; Br: 脑细胞;

HK: 头肾细胞; M: 卵母细胞膜; P: 垂体细胞; PPD: 外周部位

A1: Ovary; B1: Head-kidney; C1: Liver; D1: Brain; E1: Kidney; F1: Pituitary; A2, B2, C2, D2, E2 and F2: Ovary, head-kidney, liver, brain, kidney, and pituitary ($\times 1000$); a, b, c, d, e, and f: Negative control of ovary, head-kidney, liver, brain, kidney, and pituitary. TU: Tubules; K: Kidney; Vt: Vitellogenic oocytes; E: Edge of tissues; L: Liver; B: Blank; Br: Brain cell;

HK: Head-kidney cell; M: Oocyte membrane; PPD: Proximal part distalis

表 1 PGRMC1 在性成熟半滑舌鲷组织中的分布强度
Tab.1 Intensity distribution of PGRMC1 in different tissues of *C. semilaevis*

组织 Tissues	强阳性反应 Strong immunopositive reaction	中等阳性反应 Medium positive reaction
卵巢 Ovary	细胞膜 Cell membrane +++	细胞质 Cytoplasm ++
头肾 Head-kidney	头肾细胞 Head-kidney cells +++	
肝脏 Liver	肝静脉周围 Hepatic vein +++	
脑 Brain	神经元 Neuron +++	
肾 Kidney	肾小管附近 Renal tubule +++	
垂体 Pituitary	垂体细胞 Pituitary cell +++	

以看出 PGRMC1 在肝静脉管腔内外部位表达。在显示脑组织的图 3-D1 中, PGRMC1 主要定位在脑组织的神经元, 图 3-D2 为放大 1000 倍表达结果。图 3-E1 显示, 在肾脏组织中, PGRMC1 主要在外周组织和肾小管区域中表达, 右图 3-E2 为放大 1000 倍结果, 很明显地看出其在外周部位以及肾小管的管腔内外表达。图 3-F1 和图 3-F2 显示, 在垂体组织, PGRMC1 主要分布在垂体中分散的细胞。

3 讨论

PGRMC1 在大鼠和人颗粒/黄体细胞胆固醇代谢和性类固醇生物合成(Hughes *et al*, 2007; Suchanek *et al*, 2005), 介导孕激素在卵巢细胞中的抗凋亡和正向调控具有催化活性的芳香化酶家族基因(Mansouri *et al*, 2008), 诱导哺乳动物卵母细胞成熟(Peluso *et al*, 2008)和精子顶体反应(Bryan *et al*, 2015)等方面有重要的调控作用。前期研究已克隆得到半滑舌鲷 PGRMC1 基因全长序列, 并对 PGRMC1 mRNA 在性成熟雌性半滑舌鲷不同组织的表达特征进行了分析, 发现半滑舌鲷 PGRMC1 mRNA 组织表达广泛, 其中卵巢组织中相对表达量最高(张金勇等, 2016)。

本研究通过 Western blotting 检测 PGRMC1 蛋白在半滑舌鲷不同组织的表达水平, 显示 PGRMC1 蛋白在卵巢、脑、肝脏中表达量相对较高, 而在垂体、肾和头肾组织中也有一定的表达。免疫组化和 RNA 原位杂交实验结果显示, PGRMC1 蛋白和 mRNA 阳性信号在性成熟卵巢的卵母细胞膜上、脑内部分神经元区域和垂体内分散的细胞上有明显分布。这进一步揭示 PGRMC1 在性成熟雌性半滑舌鲷不同组织的表达特征, 即 PGRMC1 较丰富地表达于卵巢、脑和肝脏, 说明 PGRMC1 在半滑舌鲷繁殖轴和肝脏组织介导孕激素参与繁殖内分泌调控。原位杂交检测斑节对虾(*Penaeus monodon*)卵巢组织中 PGRMC1 mRNA 的杂交信号, 发现在卵巢卵黄形成早期和卵黄形成期都

有杂交信号, 并且在卵黄形成期, 卵巢比卵黄形成早期卵巢的杂交信号明显; 免疫组化显示, PGRMC1 蛋白阳性信号也存在于卵泡层和滤泡细胞细胞膜(Preechaphol *et al*, 2010); 这些研究结果表明, PGRMC1 在斑节对虾卵母细胞成熟过程中起着重要的调控作用。Mourot 等(2006)采用原位杂交方法检测到未性成熟的虹鳟鱼卵巢组织 PGRMC1 mRNA 的杂交信号; 在牛(Bovine)的卵母细胞, qRT-PCR 研究发现, PGRMC1 mRNA 表达丰富(Dode *et al*, 2006); 前期的研究表明, 在半滑舌鲷繁殖周期, 卵巢中 PGRMC1 mRNA 表达水平从卵巢发育 II-V 期稳步上升, V 期时达到最高值, VI 期时下降显著且表达水平最低($P < 0.05$)(张金勇等, 2016)。当前的研究发现, 半滑舌鲷 PGRMC1 基因和蛋白定位在成熟卵母细胞膜上, 预示 PGRMC1 在细胞膜上介导内分泌调控卵母细胞的成熟过程。另外, Western blotting 分析 PGRMC1 分布在牛的生发泡和 M II 期卵母细胞, 参与合子原核的形成; 在胚胎发育过程中, 囊胚期 PGRMC1 的表达丰富(Luciano *et al*, 2010); 在哺乳动物中, PGRMC1 参与调控胚胎发育, 但在低等脊椎动物——鱼类中 PGRMC1 的调控机制未见报道。在本研究中, PGRMC1 在具有受精能力的卵母细胞的细胞膜上表达丰富, 呈现母源基因的表达特征, 由此推测, PGRMC1 在半滑舌鲷胚胎发育过程中也可能具有重要的生理功能。

半滑舌鲷 PGRMC1 蛋白和 mRNA 定位在其肝脏组织的胆小管和肝静脉区域, 可能因为胆小管和肝静脉的管腔中分布着很多的微绒毛, 其上的细胞膜丰富, 因此, PGRMC1 有明显的杂交信号。半滑舌鲷 PGRMC1 在肝脏胆小管和肝静脉等与外界联系的管腔周围内细胞有明显的阳性信号, 这与已有的鼠 PGRMC1 的研究结果相一致(Nölte *et al*, 2000)。

本研究探明了 PGRMC1 蛋白和 mRNA 在繁殖相关组织的细胞学定位特征, 但关于 PGRMC1 的具体生理功能作用途径及机制尚不明了, 如何解析这些问

题需今后更深入的研究。

参 考 文 献

- Bryan MB, Chung-Davidson YW, Ren JF, *et al.* Evidence that progestins play an important role in spermiation and pheromone production in male sea lamprey (*Petromyzon marinus*). *General and Comparative Endocrinology*, 2015, 212: 17–27
- Dode MAN, Dufort I, Massicotte L, *et al.* Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 2006, 73(3): 288–297
- Hughes AL, Powell DW, Bard M, *et al.* Dap1/PGRMC1 binds and regulates cytochrome P450 enzymes. *Cell Metabolism*, 2007, 5(2): 143–149
- Liu L, Wang J, Zhao L, *et al.* Progesterone increases rat neural progenitor cell cycle gene expression and proliferation via extracellularly regulated kinase and progesterone receptor membrane components 1 and 2. *Endocrinology*, 2009, 150(7): 3186–3196
- Lodde V, Peluso JJ. A novel role for progesterone and progesterone receptor membrane component 1 in regulating spindle microtubule stability during rat and human ovarian cell mitosis. *Biology of Reproduction*, 2011, 84(4): 715–722
- Lösel RM, Besong D, Peluso JJ, *et al.* Progesterone receptor membrane component 1—Many tasks for a versatile protein. *Steroids*, 2008, 73(9–10): 929–934
- Luciano AM, Lodde V, Franciosi F, *et al.* Progesterone receptor membrane component 1 expression and putative function in bovine oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development. *Reproduction*, 2010, 140(5): 663–672
- Mansouri MR, Schuster J, Badhai J, *et al.* Alterations in the expression, structure and function of progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) in premature ovarian failure. *Human Molecular Genetics*, 2008, 17(23): 3776–3783
- Mourot B, Nguyen T, Fostier A, *et al.* Two unrelated putative membrane bound progestin receptors, progesterone membrane receptor component 1 (PGRMC1) and membrane progesterin receptor (mPR) beta, are expressed in the rainbow trout oocyte and exhibit similar ovarian expression patterns. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2006, 4(1): 1–14
- Nölte I, Jeckel D, Wieland FT, *et al.* Localization and topology of ratp28, a member of a novel family of putative steroid-binding proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2000, 1543(1): 123–130
- Peluso JJ, Lodde V, Liu X. Progesterone regulation of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) sumoylation and transcriptional activity in spontaneously immortalized granulosa cells. *Endocrinology*, 2012, 153(8): 3929–3939
- Peluso JJ, Romak J, Liu X. Progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) is the mediator of progesterone's antiapoptotic action in spontaneously immortalized granulosa cells as revealed by PGRMC1 small interfering ribonucleic acid treatment and functional analysis of PGRMC1 mutations. *Endocrinology*, 2008, 149(2): 534–543
- Preechaphol R, Klinbunga S, Yamano K, *et al.* Molecular cloning and expression of progesterin membrane receptor component 1(PGRMC1) of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 168(3): 440–449
- Suchanek M, Radzikowska A, Thiele C. Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells. *Nature Methods*, 2005, 2(4): 261–267
- Zhang JY, Liu XZ, Shi B, *et al.* Molecular cloning, tissue and spatio-temporal expression pattern of PGRMC1 in the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(5): 1080–1090 [张金勇, 柳学周, 史宝, 等. 半滑舌鳎孕酮受体膜组分 1 基因的克隆及组织和时空表达规律. *中国水产科学*, 2016, 23(5): 1080–1090]
- Zhang Y, Ruan XY, Tian XX, *et al.* Progress in research on possible role of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) in the mechanism of breast cancer development. *Journal of Capital Medical University*, 2013, 34(4): 496–500 [张颖, 阮祥燕, 田玄玄, 等. 孕激素受体膜组分 1 (PGRMC1)在乳腺癌发生风险方面的研究进展. *首都医科大学学报*, 2013, 34(4): 496–500]

(编辑 冯小花)

Quantitative and Qualitative Expression Analysis of the Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1) in the Tissues of Female Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)

ZHANG Jinyong^{1,3}, SHI Bao^{1,2}, LIU Xuezhou^{1,2,3}①, XU Yongjiang^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. Dalian Ocean University, Dalian 116023)

Abstract Progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) may play an important role in oocyte maturation of the female half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). To better understand the underlying mechanisms, here we measured the mRNA expression of PGRMC1 in different tissues with *in situ* RNA hybridization and immunohistochemistry, and analyzed the protein expression with western blotting. According to the results of *in situ* RNA hybridization, the mRNA of PGRMC1 was detected in the membrane of oocytes, in scattered cells of the entire pituitary, and in the neurons of the brain. Immunohistochemistry showed strong signals of PGRMC1 in the oocyte membrane of the mature ovary, and signals were also observed in the liver, kidney, and head kidney of *C. semilaevis*. In the liver, PGRMC1 was mainly expressed in the bile duct and hepatic veins that were connected to the outer tissue. In the kidney, the PGRMC1 was expressed in the vicinity of the renal tubules. The results above demonstrated that PGRMC1 was a membrane receptor that functioned on the cell membrane. We also analyzed the protein sequence of PGRMC1, selected epitope of the sequence, and synthesized the corresponding immune polypeptide. We obtained the polyclonal antibody of PGRMC1 by immunizing New Zealand rabbit with the recombinant protein. The antibody was applied to measure the expression level of PGRMC1. Western blotting results showed that the expression of PGRMC1 protein was higher in the ovary, liver, and brain, and was relatively low in the kidney, head kidney, and pituitary. Our results may provide valuable information on the physiological function of PGRMC1 in the oocyte maturation and reproductive endocrinal regulation of *C. semilaevis*

Key words *Cynoglossus semilaevis*; Oocyte maturation; PGRMC1; Expression analysis

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

GnIH 多肽对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) 下丘脑生殖相关基因表达的影响*



刘 权^{1,2} 王 滨¹ 柳学周^{1,2①} 徐永江¹ 史 宝¹ 刘增新^{1,2}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 本研究首次通过下丘脑离体孵育的方法研究促性腺激素抑制激素(Gonadotropin-inhibitory hormone, GnIH)多肽对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)下丘脑中生殖相关基因的表达调控。研究结果显示, tsGnIH-1 促进了 *gnrh2* 和 *gnih* 的表达, 对 *gnrh3* 和 *kiss2* 的表达无影响; tsGnIH-2 抑制了 *gnrh3* 的表达, 对 *gnrh2*、*kiss2* 和 *gnih* 的表达无影响。GnIH 多肽对生殖相关基因的不同调控表明同一前体蛋白编码的不同 GnIH 多肽在生殖调控中的作用不尽相同。本研究结果增加了对 GnIH 参与鱼类生殖调控机制的认识, 为深入研究奠定了基础。

关键词 半滑舌鳎; 促性腺激素抑制激素; 促性腺激素释放激素; 下丘脑; 生殖相关基因

中图分类号 S917; Q575; Q492 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0056-07

包括硬骨鱼类在内的脊椎动物生殖神经内分泌活动主要受到下丘脑-垂体-性腺轴(Hypothalamo-pituitary-gonadal axis)的调控。下丘脑神经肽促性腺激素释放激素(Gonadotropin-releasing hormone, GnRH)曾被认为是促性腺激素(Gonadotropin, GTH)神经内分泌调控的主要促进因子, 但没有一种下丘脑因子能够抑制 GTH 分泌。直到 Tsutsui 等(2000)从日本鹌鹑(*Coturnix japonica*)脑中分离出一种下丘脑十二肽(SIKPSAYLPLRFa), 因其能够抑制鹌鹑垂体 GTH 的分泌, 所以命名为促性腺激素抑制激素(Gonadotropin-inhibitory hormone, GnIH), 这是第 1 次在脊椎动物中鉴定出的具有抑制生殖功能的下丘脑多肽。随后, 从鱼类到哺乳类中都鉴定出了 GnIH 的同源基因, 并对其结构与功能的多样性开展了大量的研究(Ogawa *et al.*,

2014; Osugi *et al.*, 2014; Ubuka *et al.*, 2013; 王滨等, 2016)。

不同物种 *GnIH* 基因编码的前体多肽经过酶切加工可产生不同种类的成熟肽(Ogawa *et al.*, 2014; Osugi *et al.*, 2014; Tsutsui *et al.*, 2012)。这些多肽的 C 末端都有一个特征性基序-LPXRFa(X=L 或者 Q), 因此, 从结构看应该被称作 LPXRFa 多肽。

现在普遍认为, 在鸟类和哺乳类中 GnIH 作用于下丘脑 GnRH 神经元或者直接作用于垂体来抑制 GTH 的合成与分泌(Bentley *et al.*, 2009; Clarke *et al.*, 2014; Kriegsfeld *et al.*, 2010)。然而, GnIH 对鱼类垂体激素合成与分泌的表达调控作用仍存在争议。金鱼(*Carassius auratus*) GnIH 多肽 gfGnIH-1 促进了星点东方鲀(*Takifugu niphobles*)垂体 LH β 、FSH β 、GH 以及 PRL

* 国家自然科学基金项目(31602133; 31502145)、国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50)、山东省自然科学基金项目(ZR2016CB02)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022016018)共同资助 [This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31602133 and 31502145), China Agriculture Research System (CARS-50), Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2016CB02), and Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022016018)]. 刘 权, E-mail: liuquan90@126.com

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-08-05, 收修改稿日期: 2016-09-22

的表达(Shahjahan *et al*, 2011、2016)。腹腔注射金鱼 GnIH 多肽 gfGnIH-2 和 gfGnIH-3 显著降低了金鱼垂体 LH β /FSH β 的表达水平(Qi *et al*, 2013)。同样, 腹腔注射斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*) gGnIH-2 也降低了垂体 LH β 的表达水平(Wang *et al*, 2015)。此外, 侧脑室注射欧洲海鲈(*Dicentrarchus labrax*) sbGnIH-1 和 sbGnIH-2 的结果显示, sbGnIH-1 不影响垂体 LH β 、FSH β 和 GH 的表达, 但 sbGnIH-2 显著降低了三者的表达(Paullada-Salmeron *et al*, 2016)。综上所述, GnIH 多肽参与了脊椎动物垂体功能, 但 GnIH 在不同物种间, 尤其是硬骨鱼类中, 对垂体激素合成与分泌的作用是不同的。

除了直接作用于垂体外, GnIH 也能够通过作用于下丘脑 GnRH 神经元进而调控 GTH 的合成与分泌。然而, GnIH 对鱼类下丘脑生殖相关基因表达调控的研究较少, 尚无定论。

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)是一种重要的海水养殖经济鱼类。近年来, 对半滑舌鳎生殖相关功能基因已有一些报道, 例如 FSH β 、LH β 、GTH α 和 *mPR-Like* 等(Shi *et al*, 2015; 柳学周等, 2015), 但鲆鲽鱼类中尚未见有关 GnIH 的研究报道。为研究 GnIH 在鱼类生殖调控中的作用机制, 本研究首次通过下丘脑离体孵育实验, 结合荧光定量 PCR 技术, 研究 GnIH 多肽对下丘脑生殖相关基因(包括 *GnRH*、*kiss2* 和 *GnIH*)的表达调控影响, 以期阐明 GnIH 对半滑舌鳎生殖轴的调控作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

半滑舌鳎成熟肽 tsGnIH-1 (SLDLERLNMRVTP-TASKSSLPTIHKLYPPTVNPPIHANMPMRF-NH2) 和 tsGnIH-2 (EVEPEDDQSHNTPNMPQRF-NH2)均由上海强耀生物科技有限公司合成, 纯度 > 95%。将多肽溶于灭菌超纯水配成 1 mmol/L 母液, 分装于 PCR 管 (5 μ l/管), -80 $^{\circ}$ C 保存备用。L15 培养基干粉(Leibovitz's L15 Medium powder)及双抗(Penicillin-Streptomycin-Glutamine)均购自 Life Technologies 公司; 牛血清白蛋白 BSA (Albumin Bovine Serum, Fraction V, Fatty Acid-Poor, Endotoxin-Free)购自 Calbiochem 公司; HEPES 购自 Solabio 公司; RNA 提取试剂 RNAiso Plus、反转录试剂盒 PrimeScriptTM RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real-time)以及荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR[®]Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus)均购自 TaKaRa 公司, 其余为国产分析纯。

1.2 实验用鱼

实验用半滑舌鳎购自山东青岛钩予水产有限公司, 2 龄, 雌性, 体重为(573.8 \pm 26.6) g, 性腺指数(Gonadosomatic index, GSI=性腺重/体重 \times 100)为(1.54 \pm 0.08)%。半滑舌鳎用 0.05% 的 MS-222 麻醉后, 用剪子沿侧线的延长线剪开头部处死, 迅速取出下丘脑, 置于冰预冷的新鲜 L15 培养基中。L15 培养基配方(表 1)参照 Wang 等(2014)。取样工具在使用前均在 180 $^{\circ}$ C 烘烤 6 h, 取样结束后, 立刻将样品转移到细胞房内进一步处理。

将表 1 组分溶于 800 ml 超纯水中, 用 5 mol/L NaOH 调 pH 至 7.2, 用超纯水定容至 1 L, 用磁力搅拌器搅拌, 待充分溶解后, 用 0.2 μ m 滤膜过滤除菌, 分装至 50 ml 离心管, 用封口膜密封管盖, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

表 1 Leibovitz's L15 培养基配方
Tab.1 The formula of Leibovitz's L15 medium

组份 Components	量 Amount
L15 培养基干粉 Leibovitz's L15 Medium powder	13.7 g
4-羟乙基哌嗪乙磺酸 HEPES	1.19 g
氯化钠 NaCl	2.66 g
牛血清白蛋白 BSA	1 g
100 \times 双抗 Penicillin-Streptomycin-Glutamine	10 ml

1.3 离体孵育实验

所有操作均在无菌超净工作台中进行。将下丘脑转移到培养皿中, 用新鲜的 L15 培养液清洗 2 次。用巴氏吸管将下丘脑逐个转移至 24 孔培养板中, 每孔加入 1 ml L15 培养液, 然后放在 25 $^{\circ}$ C 的 CO₂ 培养箱 (HF 151 UV, Heal Force 公司)预孵育 1 h。预孵育结束后, 去除孵育液, 按以下方法处理: 对照组, 每孔加入 1 ml 的 L15 培养液; tsGnIH-1 实验组, 每孔加入 1 ml 终浓度为 1 μ mol/L tsGnIH-1 的 L15 培养液; tsGnIH-2 实验组, 每孔加入 1 ml 终浓度为 1 μ mol/L tsGnIH-2 的 L15 培养液, 然后将培养板放在 25 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中孵育 24 h。GnIH 多肽浓度选择参考之前已发表文献(Biran *et al*, 2014; Di Yorio *et al*, 2016)。孵育结束后, 将下丘脑转移到含有 1 ml RNAiso Plus 的 Eppendorf 管中。每个下丘脑用注射器抽打数次, 使之与 RNAiso Plus 匀浆完全, 在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存, 直至 RNA 提取。该实验重复 2 次, 每次实验每种处理 4-6 个重复。

1.4 总 RNA 提取、反转录与荧光定量检测

按照 RNAiso Plus 操作说明提取下丘脑总 RNA, 通过 NanoDrop2000C 分光光度计(Thermo 公司)测定 RNA 的纯度和浓度, 取 1 μg 总 RNA 非变性电泳(0.8% 琼脂糖凝胶)检验其完整性。纯度高且完整的 RNA 按照 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real-time)反转录试剂盒说明书进行反转录实验。反转录实验体系为 20 μl , 先取 1 μg 总 RNA 与 2 μl 5 \times gDNA Eraser Buffer、1 μl gDNA Eraser, 用无 RNase 水补充至 10 μl , 充分混匀、短暂离心后按以下反应程序进行: 42 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 将这一步的反应液与 1 μl RT Primer Mix、1 μl PrimeScript™ RT Enzyme Mix I、4 μl 5 \times PrimeScript Buffer、4 μl 无 RNase 水, 充分混匀、短暂离心后按以下反应程序进行: 37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s; 将反转录产物 10 倍稀释后-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

按照 Wang 等(2016)所述方法通过荧光定量 PCR 检测相关基因表达分析。荧光定量扩增体系为 20 μl , 包括 10 μl 2 \times SYBR®Premix Ex Taq™ II、0.8 μl 上下游引物(每种引物浓度均为 10 $\mu\text{mol/L}$)、2 μl 稀释的 cDNA 模板和 7.2 μl 无菌水, 充分混匀、短暂离心后通过 Mastercycler ep realplex Real-time PCR 仪(Eppendorf 公司)进行荧光定量检测, 每个样品 3 个平行, PCR 程序采用两步法: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 共 40 个循环。反应结束后进行熔解曲线分析以及 PCR 产物测序, 进而验证产物特异性。18S 作为内参基因, 定量 PCR 检测所使用的引物(利用 Primer premier 5.0 设计)以及它们的扩增片段长度与扩增效

率等信息见表 2。基因相对表达量参照 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算(Livak *et al*, 2001), 结果以平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)表示。采用 SPSS 17 进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 与 Duncan 多重比较, $P < 0.05$ 认为有显著性统计差异。

2 结果

2.1 GnIH 多肽对 *gnrh2* mRNA 表达量的影响

以对照组作为参照, 研究比较 tsGnIH-1 与 tsGnIH-2 对半滑舌鲷下丘脑 *gnrh2* mRNA 表达量的影响。如图 1 所示, tsGnIH-1 多肽显著促进了 *gnrh2* mRNA 的表达水平($P < 0.05$), tsGnIH-1 处理组 *gnrh2* mRNA 的表达量是对照组的 1.85 倍; 而 tsGnIH-2 多肽有所降低了 *gnrh2* mRNA 表达量, 与对照组相比无显著差异。

2.2 GnIH 多肽对 *gnrh3* mRNA 表达量的影响

以对照组作为参照, 研究比较 tsGnIH-1 与 tsGnIH-2 对半滑舌鲷下丘脑 *gnrh3* mRNA 表达量的影响。如图 2 所示, tsGnIH-2 多肽显著抑制了 *gnrh3* mRNA 的表达水平($P < 0.05$), tsGnIH-2 处理组 *gnrh3* mRNA 表达量为对照组的 39%; 然而, tsGnIH-1 多肽不影响 *gnrh3* mRNA 的表达水平, tsGnIH-1 处理组 *gnrh3* mRNA 表达量较对照组增加 6%。

2.3 GnIH 多肽对 *kiss2* mRNA 表达量的影响

为了研究 GnIH 多肽是否通过 Kiss 系统调控半滑舌鲷生殖, 以对照组作为参照, 分析比较了 tsGnIH-1

表 2 定量 PCR 引物信息

Tab.2 Primer information for quantitative Real-Time PCR

名称 Name	引物序列 Primer sequence(5'-3')	扩增长度 Amplicon size(bp)	扩增效率 PCR efficiency	GenBank 登录号 GenBank Accession No.
GnIH-F	GGAAATCAGCCTACAGTGACAAAA	120	1.11	KU612223
GnIH-R	GCCTCTCCAAGTCCAAACTCC			
kiss2-F	GGCAACTGCTGTGCAACGA	133	1.01	KX090946
kiss2-R	AAGACAGAAAGCGGGGAGAAC			
GnRH2-F	GGAATCTGAACTGGAGAACTGCT	121	1.09	KX090947
GnRH2-R	TGGCTGCTCACAACCTTTATCAC			
GnRH3-F	AGGCAGCAGAGTGATCGTG	92	1.08	JQ028869
GnRH-R	CACCTGGTAGCCATCCATAAGAC			
18S F	GGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC	107	1.00	GQ426786
18S R	AGTGGGGTTTCAGCGGGTTAC			

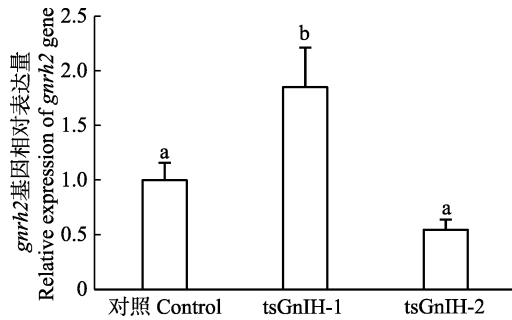


图 1 半滑舌鲷 GnIH 多肽对离体孵育下丘脑 *gnrh2* mRNA 表达量的影响

Fig.1 *in vitro* effects of GnIH peptides on *gnrh2* mRNA levels in the hypothalamus of *C. semilaevis*

不同字母表示不同组之间有显著性差异, 下同

Groups with different letters are significantly different from each other, the same as below

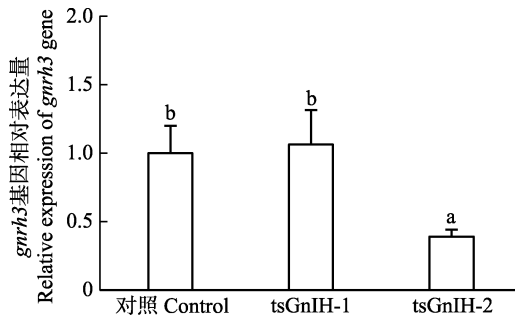


图 2 半滑舌鲷 GnIH 多肽对离体孵育下丘脑 *gnrh3* mRNA 表达量的影响

Fig.2 *in vitro* effects of GnIH peptides on *gnrh3* mRNA levels in the hypothalamus of *C. semilaevis*

与 tsGnIH-2 对半滑舌鲷下丘脑 *kiss2* mRNA 表达量的影响。如图 3 所示, tsGnIH-1 处理组 *kiss2* mRNA 的表达量为对照组的 85%, 而 tsGnIH-2 处理组 *kiss2* mRNA 的表达量为对照组的 95%。结果表明, tsGnIH-1 与 tsGnIH-2 多肽均不影响 *kiss2* mRNA 的表达水平。

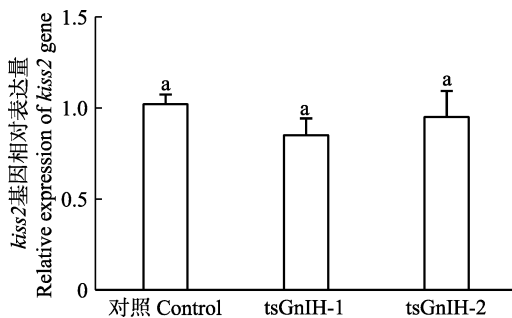


图 3 半滑舌鲷 GnIH 多肽对离体孵育下丘脑 *kiss2* mRNA 表达量的影响

Fig.3 *in vitro* effects of GnIH peptides on *kiss2* mRNA levels in the hypothalamus of *C. semilaevis*

2.4 GnIH 多肽对 *gnih* mRNA 表达量的影响

为了研究 GnIH 多肽对 GnIH 系统的自调控, 以对照组作为参照, 分析比较了 tsGnIH-1 与 tsGnIH-2 对半滑舌鲷下丘脑 *gnih* mRNA 表达量的影响。如图 4 所示, tsGnIH-1 多肽显著促进了 *gnih* mRNA 的表达水平 ($P < 0.05$), tsGnIH-1 处理组 *gnih* mRNA 表达量为对照组的 1.61 倍; 然而, tsGnIH-2 多肽不影响 *gnih* mRNA 的表达水平, tsGnIH-2 处理组 *gnih* mRNA 表达量为对照组的 83.53%。

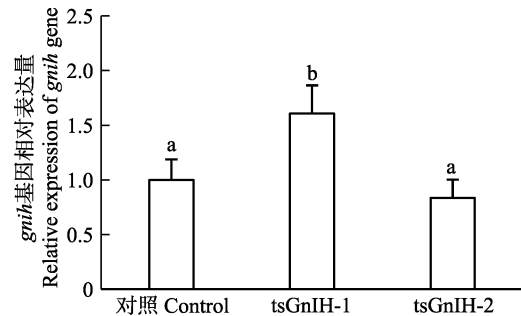


图 4 半滑舌鲷 GnIH 多肽对离体孵育下丘脑 *gnih* mRNA 表达量的影响

Fig.4 *in vitro* effects of GnIH peptides on *gnih* mRNA levels in the hypothalamus of *C. semilaevis*

3 讨论

GnIH 是最近发现的一种新型下丘脑神经肽, 也是目前脊椎动物中唯一发现的生殖抑制因子, 其在鸟类和哺乳类生殖调控中的作用受到了广泛研究, 然而, 有关 GnIH 对鱼类生殖调控的研究相对较少, 尤其是 GnIH 在鱼类生殖调控中的精确作用及其分子机制尚未阐明 (Kriegsfeld *et al*, 2015; Tsutsui *et al*, 2015; Ubuka *et al*, 2016)。目前, 在金鱼、斑马鱼 (*Danio rerio*)、星点东方鲃、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)、斜带石斑鱼和欧洲海鲈等鉴定出了 GnIH 同源基因, 并对其调控鱼类生殖活动的功能进行了初步研究 (Kriegsfeld *et al*, 2015; Tsutsui *et al*, 2015; Ubuka *et al*, 2016)。为了进一步研究 GnIH 在鱼类生殖调控中的作用机制, 本研究首次通过下丘脑离体孵育的方法研究了 GnIH 多肽对半滑舌鲷下丘脑生殖相关基因的表达调控。

在之前的研究中, 通常采用在体手段 (腹腔注射或者侧脑室注射) 研究 GnIH 对下丘脑生殖相关基因的表达调控。然而, 多种内源性因子参与或者互相作用, 导致在体实验结果经常很难解释。因此, 本研究采用下丘脑离体孵育方法研究 GnIH 多肽对半滑舌鲷下丘脑生殖相关基因的表达调控, 避免了内源性因子

的影响。GnRH 是垂体 GTH 合成与分泌的主要促进因子,在脊椎动物中已经鉴定出了 15 种 GnRH 亚型,其中 8 种存在于硬骨鱼类中;每种硬骨鱼类中存在至少 2 种形式的 GnRH 多肽(Ohkubo *et al.*, 2010)。目前,在半滑舌鳎中鉴定出 2 种 *gnrh* 基因,即 *gnrh2* (GenBank 登录号: KX090947)和 *gnrh3* (GenBank 登录号: JQ028869)。在本研究中, tsGnIH-1 促进了半滑舌鳎下丘脑 *gnrh2* 的表达,但不影响 *gnrh3* 的表达。侧脑室注射欧洲海鲈 sbGnIH-1 和腹腔注射斜带石斑鱼 gGnIH-1 均不影响 *gnrh3* 的表达(Paullada-Salmeron *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2015)。然而,侧脑室注射欧洲海鲈 sbGnIH-1 也不影响 *gnrh2* 的表达(Paullada-Salmeron *et al.*, 2016)。不同于 tsGnIH-1, tsGnIH-2 显著降低了半滑舌鳎下丘脑 *gnrh3* 的表达,但不影响 *gnrh2* 的表达。腹腔注射金鱼 gfGnIH-2 显著降低了 *gnrh3* 的表达,但不影响 *gnrh2* 的表达(Qi *et al.*, 2013)。相反,侧脑室注射欧洲海鲈 sbGnIH-2 显著降低了 *gnrh2* 的表达,但不影响 *gnrh3* 的表达(Paullada-Salmeron *et al.*, 2016); 腹腔注射斜带石斑鱼 gGnIH-2 也不影响 *gnrh3* 的表达(Wang *et al.*, 2015)。半滑舌鳎和欧洲海鲈中只存在 2 种 GnIH 多肽,然而,在金鱼和斜带石斑鱼中存在 3 种 GnIH 多肽。腹腔注射金鱼 gfGnIH-3 不影响 *gnrh2* 的表达,但抑制了 *gnrh3* 的表达(Qi *et al.*, 2013)。相反,腹腔注射斜带石斑鱼 gGnIH-3 却促进了 *gnrh3* 的表达(Wang *et al.*, 2015)。综上所述, GnIH 对下丘脑 GnRH 亚型的不同调控具有物种特异性,甚至同一前体蛋白编码的不同 GnIH 多肽具有不同的功能。

Kiss 也是生殖调控的一种新型下丘脑神经肽,通过直接作用于 GnRH 神经元促进 GnRH 分泌进而上调生殖轴,是青春期启动的一个关键因子(Tsutsui *et al.*, 2010)。在斑马鱼、金鱼、青鳉(*Oryzias latipes*)、欧洲海鲈和鲈鱼(*Scomber japonicus*)中存在 2 种 *kiss* 基因,即 *kiss1* 和 *kiss2*; 然而,在塞内加尔鳎(*Solea senegalensis*)、星点东方鲀和斜带石斑鱼中只存在 *kiss2* 基因(Mechaly *et al.*, 2013)。目前,在半滑舌鳎中也只鉴定出了部分 *kiss2* 序列(GenBank 登录号: KX090946)。在本研究中, tsGnIH-1 和 tsGnIH-2 均不影响 *kiss2* 表达。同样,腹腔注射斜带石斑鱼 3 种 GnIH 多肽均不影响 *kiss1* 及 *kiss2* 的表达(Wang *et al.*, 2015)。哺乳类 GnIH 同源多肽 RFRP3 也不影响大鼠 *kiss1* 表达(Johnson *et al.*, 2008)。上述结果说明, GnIH 多肽对 GnRH 亚型的表达调控可能不需要 Kiss 系统介导。此外,侧脑室注射欧洲海鲈 sbGnIH-1 也不影响 *kiss1* 和 *kiss2* 的表达,

但 sbGnIH-2 均降低了 *kiss1* 及 *kiss2* 的表达,这说明在欧洲海鲈中, sbGnIH-2 主要发挥生殖调控的抑制作用(Paullada-Salmeron *et al.*, 2016)。

本研究也探索了 GnIH 对其自身前体基因的表达调控。结果表明, tsGnIH-1 上调了半滑舌鳎下丘脑 *gnih* 表达,然而, tsGnIH-2 对 *gnih* 表达无影响。同样,腹腔注射金鱼 gfGnIH-3 也促进了小丑鱼 *gnih* 表达(Choi *et al.*, 2016)。然而,侧脑室注射欧洲海鲈 sbGnIH-1 不影响 *gnih* 的表达, sbGnIH-2 却抑制了 *gnih* 的表达(Paullada-Salmeron *et al.*, 2016)。在哺乳类和鸟类中已证实多种因子(例如光照、压力等)影响了 *gnih* 的表达,进而影响季节性生殖调控(Tsutsui, 2009; Tsutsui *et al.*, 2015; Ubuka *et al.*, 2008)。鱼类生殖活动也受到光照等环境因子的影响, GnIH 是否参与了鱼类季节性生殖活动需要进一步深入研究。

4 小结

GnIH 是一个多功能的神经肽,在下丘脑-垂体-性腺轴多个水平参与了生殖调控。GnIH 对鱼类生殖调控的作用仍存在争议,需要进一步深入研究; GnIH 调控鱼类垂体激素合成与分泌的信号转导机制网络需要进一步完善; GnIH 与其他因子之间如何互相作用、在垂体水平将多种信号整合进而调控生殖等生理过程仍不清楚(王滨等, 2016)。本研究首次通过下丘脑离体孵育的方法研究了 GnIH 多肽对半滑舌鳎下丘脑生殖相关基因的表达调控。结果表明, tsGnIH-1 促进了 *gnrh2* 和 *gnih* 的表达,对 *gnrh3* 和 *kiss2* 的表达无影响; tsGnIH-2 抑制了 *gnrh3* 的表达,对 *gnrh2*、*kiss2* 和 *gnih* 的表达无影响。GnIH 多肽对生殖相关基因的不同调控表明了生殖调控的复杂性,即使同一前体蛋白编码的不同 GnIH 多肽在生殖调控中的作用也不尽相同。该研究结果增加了对 GnIH 参与鱼类生殖调控机制的认识,为下一步研究奠定了基础。

参 考 文 献

- Bentley GE, Ubuka T, McGuire NL, *et al.* Gonadotrophin-inhibitory hormone: A multifunctional neuropeptide. *Journal of Neuroendocrinology*, 2009, 21(4): 276-281
- Choi YJ, Kim NN, Habibi HR, *et al.* Effects of gonadotropin inhibitory hormone or gonadotropin-releasing hormone on reproduction-related genes in the protandrous cinnamom clownfish, *Amphiprion melanopus*. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 235: 89-99
- Clarke IJ, Parkington HC. Gonadotropin inhibitory hormone

- (GnIH) as a regulator of gonadotropes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2014, 385(1–2): 36–44
- Di Yorio MP, Perez Sirkin DI, Delgadin TH, *et al.* Gonadotrophin-inhibitory hormone in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*: Structure, brain distribution and differential effects on the secretion of gonadotrophins and growth hormone. *Journal of Neuroendocrinology*, 2016, 28(5), doi: 10.1111/jne.12377
- Johnson MA, Fraley GS. Rat RFRP-3 alters hypothalamic GHRH expression and growth hormone secretion but does not affect KiSS-1 gene expression or the onset of puberty in male rats. *Neuroendocrinology*, 2008, 88(4): 305–315
- Kriegsfeld LJ, Gibson EM, Williams WP 3rd, *et al.* The roles of RFamide-related peptide-3 in mammalian reproductive function and behaviour. *Journal of Neuroendocrinology*, 2010, 22(7): 692–700
- Kriegsfeld LJ, Ubuka T, Bentley GE, *et al.* Seasonal control of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) in birds and mammals. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2015, 37: 65–75
- Liu XZ, Shi B, Li XX, *et al.* Molecular characterization of the novel membrane progesterin receptor gene and its role during ovarian development in the half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(4): 608–619 [柳学周, 史宝, 李晓晓, 等. 半滑舌鳎新型膜孕激素受体基因分子特征及其在卵巢发育过程的作用. *中国水产科学*, 2015, 22(4): 608–619]
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- Mechaly AS, Vinas J, Piferrer F. The kisspeptin system genes in teleost fish, their structure and regulation, with particular attention to the situation in Pleuronectiformes. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 188: 258–268
- Ogawa S, Parhar IS. Structural and functional divergence of gonadotropin-inhibitory hormone from jawless fish to mammals. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 2014, 5: 177
- Ohkubo M, Aranishi F, Shimizu A. Molecular cloning and brain distribution of three types of gonadotropin-releasing hormone from mummichog *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Fish Biology*, 2010, 76(2): 379–394
- Osugi T, Ubuka T, Tsutsui K. Review: evolution of GnIH and related peptides structure and function in the chordates. *Frontiers in Neuroscience*, 2014, 8: 255
- Paullada-Salmeron JA, Cowan M, Aliaga-Guerrero M, *et al.* Gonadotropin inhibitory hormone down-regulates the brain-pituitary reproductive axis of male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biology of Reproduction*, 2016, 94(6): 121
- Qi X, Zhou W, Li S, *et al.* Evidences for the regulation of GnRH and GTH expression by GnIH in the goldfish, *Carassius auratus*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2013, 366(1): 9–20
- Shahjahan M, Doi H, Ando H. LPXRFamide peptide stimulates growth hormone and prolactin gene expression during the spawning period in the grass puffer, a semi-lunar synchronized spawner. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 227: 77–83
- Shahjahan M, Ikegami T, Osugi T, *et al.* Synchronised expressions of LPXRFamide peptide and its receptor genes: seasonal, diurnal and circadian changes during spawning period in grass puffer. *Journal of Neuroendocrinology*, 2011, 23(1): 39–51
- Shi B, Liu X, Xu Y, *et al.* Molecular characterization of three gonadotropin subunits and their expression patterns during ovarian maturation in *Cynoglossus semilaevis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(2): 2767–2793
- Tsutsui KA. New key neurohormone controlling reproduction, gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): Biosynthesis, mode of action and functional significance. *Progress in Neurobiology*, 2009, 88(1): 76–88
- Tsutsui K, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, *et al.* Discovery and evolutionary history of gonadotropin-inhibitory hormone and kisspeptin: New key neuropeptides controlling reproduction. *Journal of Neuroendocrinology*, 2010, 22(7): 716–727
- Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, *et al.* A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 275(2): 661–667
- Tsutsui K, Ubuka T, Bentley GE, *et al.* Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): discovery, progress and prospect. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, 177(3): 305–314
- Tsutsui K, Ubuka T, Son YL, *et al.* Contribution of GnIH research to the progress of reproductive neuroendocrinology. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 2015, 6: 179
- Ubuka T, McGuire NL, Calisi RM, *et al.* The control of reproductive physiology and behavior by gonadotropin-inhibitory hormone. *Integrative and Comparative Biology*, 2008, 48(5): 560–569
- Ubuka T, Son YL, Bentley GE, *et al.* Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH), GnIH receptor and cell signaling. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 190(9): 10–17
- Ubuka T, Son YL, Tsutsui K. Molecular, cellular, morphological, physiological and behavioral aspects of gonadotropin-inhibitory hormone. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 227: 27–50
- Wang B, Jia J, Yang G, *et al.* *In vitro* effects of somatostatin on the growth hormone-insulin-like growth factor axis in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 237: 1–9
- Wang B, Liu XZ, Xu YJ, *et al.* Progress of research on gonadotropin-inhibitory hormone and its receptors in fish.

- Journal of Fisheries of China, 2016, 40(2): 278–287 [王滨, 柳学周, 徐永江, 等. 鱼类促性腺激素抑制激素及其受体的研究进展. 水产学报, 2016, 40(2): 278–287]
- Wang B, Qin C, Zhang C, *et al.* Differential involvement of signaling pathways in the regulation of growth hormone release by somatostatin and growth hormone-releasing hormone in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). Molecular and Cellular Endocrinology, 2014, 382(2): 851–859
- Wang Q, Qi X, Guo Y, *et al.* Molecular identification of GnIH/GnIHR signal and its reproductive function in protogynous hermaphroditic orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). General and Comparative Endocrinology, 2015, 216: 9–23

(编辑 冯小花)

Effects of Gonadotropin-Inhibitory Hormone Peptides on the Reproduction-Related Gene Expression in the Hypothalamus of Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)

LIU Quan^{1,2}, WANG Bin¹, LIU Xuezhou^{1,2}①, XU Yongjiang¹, SHI Bao¹, LIU Zengxin^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract The neuroendocrine regulation of reproduction in vertebrates, including fish, is primarily controlled by the hypothalamo-pituitary-gonadal (HPG) axis, with each component secreting specific neuropeptides or hormones. A classic example of such regulation is the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system. It was believed that GnRH was the only hypothalamic stimulator of the release of pituitary gonadotropins, and that there was no inhibitory neuropeptide in the reproductive axis. However, this notion has been challenged by the recent discovery of a vertebrate hypothalamic neuropeptide that suppresses pituitary gonadotropins release. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) is a novel hypothalamic neuropeptide which was identified in 2000 from the brain of Japanese quail (*Coturnix japonica*). To date, GnIH orthologs have been isolated from fish to mammals and GnIH is the only reported inhibitor of reproduction in any vertebrate. GnIH acts on the pituitary and on GnRH neurons in the hypothalamus to decrease gonadotropin synthesis and release, inhibiting gonadal development and maintenance via a novel G-protein-coupled receptor (GPR147). It is well accepted that GnIH acts as an inhibitory factor in the control of reproduction in birds and mammals. However, the role of GnIH in the control of gonadotropin synthesis and release has been debatable in fish. In this study, we evaluated the effects of GnIH peptides on the reproduction-related gene expression in the hypothalamus of half-smooth tongue sole using a primary hypothalamus culture system for the first time. Our results showed that tsGnIH-1 increased the expression of *gnrh2* and *gnih* mRNAs, but had no effects on *gnrh3* or *kiss2* mRNA expression. On the other hand, tsGnIH2 significantly inhibited *gnrh3* mRNA expression. However, tsGnIH2 altered neither *gnrh2*, *kiss2* nor *gnih* mRNA levels. Our findings suggested that GnIH peptides derived from the same precursor played different roles in the reproduction-related gene expression in tongue sole, and provided information for the future studies on the regulation of reproduction by GnIH peptides in fish.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH); Gonadotropin-releasing hormone (GnRH); Hypothalamus; Reproduction-related gene

① Corresponding author: LIU Xuezhou. E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

DOI: 10.11758/yykxjz.20160816002

http://www.yykxjz.cn/

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) *gnrh2* 基因克隆、 组织分布及卵巢成熟过程中表达分析*

王 滨^{1,2} 柳学周^{1,2①} 刘 权^{1,3} 赵 明¹
徐永江^{1,2} 史 宝^{1,2}



(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室
海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 为了研究下丘脑神经肽促性腺激素释放激素(Gonadotropin-releasing hormone 2, GnRH2)在半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)卵巢成熟过程中的生理作用,本研究通过 RT-PCR 及 RACE 方法获得了半滑舌鳎 GnRH2 全长 cDNA 序列;通过实时荧光定量 PCR(qPCR)对 *gnrh2* mRNA 的组织分布以及卵巢成熟过程中的时空表达特性进行了分析。结果显示,半滑舌鳎 GnRH2 全长 cDNA 序列为 538 bp (不包括 polyA 尾),其中,5'非编码区(Untranslated region, UTR)为 154 bp,3'UTR 为 126 bp,开放阅读框(Open reading frame, ORF)为 258 bp,编码 85 个氨基酸的前体多肽,其分子量及等电点分别为 9.69 kDa 和 8.55。GnRH2 前体多肽由信号肽、GnRH2 十肽、酶切位点(GKR)以及 GnRH 相关肽共 4 部分组成。序列比对分析发现,GnRH2 在鱼类中源性极高,尤其是十肽(QHWSHGWYPG)在所有硬骨鱼类中完全相同。半滑舌鳎 GnRH2 与鲈形目源性最高(89.41%–90.59%),其次为鲹形目、鲑形目和鲑形目(78.82%–85.88%),与鲤形目源性最低(61.18%–71.76%)。*gnrh2* mRNA 主要在脑中表达,在垂体及其他外周组织中表达量极低。此外,组织学分析显示,半滑舌鳎卵巢发育共分为 5 个时期(II、III、IV、V 和 VI 期)。在卵巢成熟过程中,脑 *gnrh2* mRNA 表达量在卵黄生成期(III 期)显著性增加,达到峰值;随后表达量急剧下降,在成熟期(V 期)达到最小值;在排卵后期(VI 期)又显著性增加。然而,在卵巢成熟过程中,垂体 *gnrh2* mRNA 表达量在卵黄生成后期(IV 期)显著性降低,随后在成熟期(V 期)有所增加,但在排卵后期(VI 期)又急剧下降。上述研究结果表明,脑 GnRH2 可能参与了半滑舌鳎卵巢发育过程。

关键词 半滑舌鳎;促性腺激素释放激素 2;基因克隆和表达;卵巢成熟

中图分类号 S917; Q575; Q492 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0063-10

硬骨鱼类的性腺成熟主要受到脑-垂体-性腺轴 (Gonadotropin-releasing hormone, GnRH)促进垂体促性腺激素(Gonadotropins, GTHs)即促卵泡激素(Follicle-

* 国家自然科学基金项目(31602133; 31502145)、国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50)、山东省自然科学基金项目(ZR2016CB02)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022016018)共同资助 [This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31602133 and 31502145), China Agriculture Research System (CARS-50), Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2016CB02), and Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022016018)]

王 滨, E-mail: wangbin@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-08-16, 收修改稿日期: 2016-09-21

stimulating hormone, FSH)和黄体生成素(Luteinizing hormone, LH)的合成与分泌, GTHs 进而作用于性腺促进类固醇激素的分泌。到目前为止,在脊椎动物中已经鉴定出 15 种 GnRH 亚型,其中,8 种存在于硬骨鱼类中;每种硬骨鱼类中存在至少 2 种形式的 GnRH 多肽(Ohkubo *et al.*, 2010)。进化和功能分析表明, GnRH 分为 3 大支: GnRH1 (之前被称作 seabream GnRH)、GnRH2 (之前被称作 chicken GnRH-II)及 GnRH3 (之前被称作 salmon GnRH)。GnRH1 是一种物种特异性的 GnRH 多肽,主要在嗅球、端脑腹侧及视前区表达,通过促进垂体 GTHs 合成与分泌进而调控性腺成熟; GnRH2 从鱼类到哺乳类动物高度保守, GnRH2 神经元位于中脑盖,并且其神经元轴突广泛分布于整个中枢神经系统,可能参与了性行为 and 摄食行为; GnRH3 是鱼类所特有的一种亚型,位于前脑腹侧,在嗅球、端脑腹侧及视前区与 GnRH1 有部分重叠分布,可能参与神经调节功能(Hildahl *et al.*, 2011; Shahjahan *et al.*, 2010)。

目前,已在多种鱼类中鉴定出了 GnRH2 同源基因,从鱼类到哺乳类 GnRH2 前体氨基酸序列高度保守,均由信号肽、GnRH2 十肽、酶切位点及 GnRH 相关肽组成(Guilgur *et al.*, 2006)。尽管 GnRH2 高度保守,然而其生理学功能研究较少,尤其是 GnRH2 在鱼类生殖调控中的生理作用仍不清楚。与其他性腺时期相比,黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)和小丑鱼(*Amphiprion melanopus*)性腺 *gnrh2* mRNA 在成熟精巢和成熟卵巢中表达量较高,说明 GnRH2 可能参与了二者性腺发育和性逆转(An *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2012)。然而,美洲黑石斑(*Centropristis striata*)脑 *gnrh2* mRNA 水平在性逆转过程中保持稳定(Breton *et al.*, 2015)。此外,在银汉鱼(*Odontesthes bonariensis*)、星点东方鲀(*Takifugu niphobles*)、大西洋鲑(*Gadus morhua*)以及圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)卵巢成熟过程中脑 *gnrh2* mRNA 水平基本保持不变(Guilgur *et al.*, 2009; Hildahl *et al.*, 2011; Shahjahan *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2012)。鲑鱼(*Scomber japonicus*)脑和垂体 *gnrh2* mRNA 表达量以及脑中 GnRH2 多肽含量在卵巢成熟过程中也没有发生显著性变化(Selvaraj *et al.*, 2012)。上述结果说明, GnRH2 可能没有直接参与上述鱼类性腺发育成熟过程。然而,鲑鱼脑 *gnrh2* mRNA 表达量在性腺分化过程中显著性减少(Selvaraj *et al.*, 2015)。鳊鱼(*Mugil cephalus*)脑 *gnrh2* mRNA 表达量在卵巢成熟过程中也显著性降低(Nocillado *et al.*, 2007)。相反,大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)脑中 GnRH2 含量随着卵母细胞直径增加而升高,并且一直持续到排卵后期

仍保持较高水平(Andersson *et al.*, 2001)。综上所述, GnRH2 在鱼类性腺成熟过程中的生理作用尚未完全阐明,需要进一步深入研究。

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)是一种重要的海水养殖经济鱼类。近年来,对于半滑舌鳎生殖相关功能基因研究已有过一些报道,例如 *FSH β* 、*LH β* 、*GTH α* 、*mPR-like* 等(Shi *et al.*, 2015; 柳学周等, 2015)。为了进一步研究 GnRH2 在半滑舌鳎卵巢成熟过程中的生理作用,本研究通过 RT-PCR 及 RACE 方法获得 GnRH2 全长 cDNA 序列,并通过实时荧光定量 PCR(qPCR)方法研究了 *gnrh2* mRNA 的组织分布和在卵巢成熟过程中的时空表达特性,旨在为半滑舌鳎生殖内分泌研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验鱼及试剂耗材

实验所用半滑舌鳎购自山东海阳市黄海水产有限公司,其中,克隆及组织分布所用半滑舌鳎为 2 龄雌鱼,体重为 553.0–844.1 g,体长为 48.0–53.0 cm; 卵巢发育不同时期所用半滑舌鳎为性成熟 3 龄雌鱼,体重为 1183.9–1349.2 g,体长为 52.0–59.0 cm。

RNA 提取试剂 RNAiso Plus、反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real-time)及荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)购自 TaKaRa 公司; RACE 试剂盒 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司; 胶回收试剂盒 Zymoclean Gel DNA Recovery Kit 购自 ZYMO 公司; pEASY-T1 载体以及 Trans1-T1 Phage Resistant 感受态细胞购自全式金公司; 其余为国产分析纯。引物和测序均由生工生物工程(上海)有限公司完成。无 RNA 酶 EP 管及 PCR 管购自 Axygen 公司; NanoDrop2000C 分光光度计购自 Thermo 公司; Veriti™ 96-孔热循环仪购自 Applied Biosystems 公司; 荧光定量 Mastercycler ep realplex Real-time PCR 仪购自 Eppendorf 公司。

1.2 GnRH2 全长 cDNA 克隆及序列分析

半滑舌鳎用 0.05% MS-222 麻醉后,用剪刀沿侧线剪开头部处死,迅速取出全脑,置于液氮中。按照 RNAiso-Plus 操作说明提取总 RNA,通过 NanoDrop2000C 分光光度计测定 RNA 的纯度和浓度,通过 1%琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 的完整性。纯度高且完整的 RNA 按照 RACE cDNA Amplification Kit 进行反转录,得到 3'-RACE-Ready cDNA 和 5'-RACE-Ready cDNA。根据已知其他鱼类 GnRH2 的保守序列设计引物

(表 1), 以上述 cDNA 为模板, 分别进行 3'/5'RACE。第 1 轮 PCR 反应体系: 10×PCR Buffer 2.5 μl, dNTP Mixture (10 mmol/L) 2 μl, GnRH2-F1/GnRH2-R1 (10 μmol/L) 0.5 μl, UPM (long) 2.5 μl, *Taq* 聚合酶 0.2 μl, cDNA 1 μl, ddH₂O 补至 25 μl。第 1 轮 PCR 程序: 94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 10 个循环, 每个循环退火温度下降 1℃; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 20 个循环, 72℃ 10 min。第 2 轮(巢式)PCR 扩增体系中以第 1 轮 PCR 产物为模板, UPM(short)替代 UPM(long), GnRH2-F2/GnRH2-R2(10 μmol/L)替代 GnRH2-F1/GnRH2-R1(10 μmol/L), 其余组分均不变。巢式 PCR 程序: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 30 个循环; 72℃ 10 min。以 1.5%的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测, 将符合目的基因大小的条带

按照 Gel DNA Recovery Kit 说明书进行胶回收。将胶回收产物与 pEASY-T1 载体 25℃连接 10 min 后转化 Trans1-T1 Phage Resistant 感受态细胞, 进行蓝白斑筛选。挑取阳性单克隆, 经菌液 PCR 验证后条带大小合适的菌液样品送至生工生物工程(上海)有限公司测序。

将测序所得的片段进行拼接, 获得半滑舌鲷 GnRH2 全长 cDNA 序列。通过 DNAMAN 软件推导其氨基酸序列; 利用在线软件 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测信号肽; 利用在线软件 Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)进行同源性序列比对; 利用软件 Mega 6.06 通过邻接法(NJ)构建进化树, 1000 次自举(bootstrap)重复检验进化树的置信度; 利用在线软件 ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/)推断前体多肽的分子量及等电点。

表 1 本研究所用引物

Tab.1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	目的 Purpose
GnRH2-F1	GTTCTGTTGCTGGGGCTGCTTCT	3'RACE, 1st PCR
GnRH2-F2	CAYTGGTCNCAYGGNTGGTAYCC	3'RACE, 2nd PCR
GnRH2-R1	CTGGGAAGGATCACCATAGAAA	5'RACE, 1st PCR
GnRH2-R2	ATAATGTCTTTTCAGAAATGCTCC	5'RACE, 2nd PCR
UPM (long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	Universal primers
UPM (short)	CTAATACGAC TCACTATAGGGC	
GnRH2-F3	GGAATCTGAACTGGAGAACTGCT	q-PCR
GnRH2-R3	TGGCTGCTCACAACCTTTATCAC	
18S-F	GGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC	
18S-R	AGTGGGGTTCAGCGGGTTAC	

1.3 *gnrh2* mRNA 组织分布及卵巢成熟过程中表达分析

为了检测 *gnrh2* mRNA 在半滑舌鲷中的组织分布, 取 3 条雌性半滑舌鲷用 0.05% MS-222 麻醉后, 用剪刀沿侧线剪开头部处死, 迅速取出脑、垂体、鳃、心、肝、脾、肾、胃、肠、肌肉及卵巢置于液氮中保存至 RNA 提取。

将处于卵巢不同发育阶段的半滑舌鲷用 0.05% MS-222 麻醉后, 用剪刀沿侧线剪开头部处死, 迅速取出性腺置于 Davis 固定液中固定 24 h 后, 转入 70% 酒精保存, 用于组织切片分析; 同时, 将脑和垂体置于液氮中保存至 RNA 提取。参考柳学周等(2009)半滑舌鲷卵巢发育组织学研究中的分类标准, 对卵巢组织切片的 HE 染色结果进行分析并确定卵巢发育时期。将各个时期对应的脑和垂体样品经 RNA 提取、反转录后, 通过荧光定量 PCR 检测 *gnrh2* mRNA 在

卵巢成熟过程中的表达特性。

1.4 总 RNA 提取、反转录与荧光定量检测

按照 RNAiso Plus 操作说明提取组织总 RNA, 通过 NanoDrop2000C 分光光度计测定 RNA 的纯度和浓度, 通过 1%琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 的完整性。纯度高且完整的 RNA 按照 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real-time)反转录试剂盒说明书进行反转录实验。反转录实验体系为 20 μl, 先取 1 μg 总 RNA 与 2 μl 5×g DNA Eraser Buffer、1 μl gDNA Eraser, 用无 RNase 水补充至 10 μl, 缓慢混匀、短暂离心, 按以下反应程序进行: 42℃ 2 min; 将这一步的反应液与 1 μl RT Primer Mix、1 μl PrimeScript™ RT Enzyme Mix I、4 μl 5×PrimeScript Buffer、4 μl 无 RNase 水, 缓慢混匀、短暂离心, 按以下反应程序进行: 37℃ 15 min, 85℃ 5 s; 将反转录产物 10 倍稀释后-20℃保存备用。

按照 Wang 等(2016)所述方法通过荧光定量 PCR 检测相关基因的表达。荧光定量扩增体系为 20 μl, 包括 10 μl 2×SYBR® Premix Ex Taq™ II、0.8 μl 上下游引物(每种引物浓度均为 10 μmol/L)、2 μl 稀释的 cDNA 模板以及 7.2 μl 无菌水, 缓慢混匀、短暂离心后, 通过 Mastercycler ep realplex Real-time PCR 仪(Eppendorf)进行荧光定量检测, 每个样品 3 个平行, PCR 程序采用两步法: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 20 s, 共 40 个循环。反应结束后进行熔解曲线分析以验证产物特异性。18S 作为内参基因, 本研究所用引物信息见表 1。基因相对表达量参照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算, 结果以平均值±标准误(Mean±SE)表示。采用 SPSS 17 进行单因素方差分析(One-way ANOVA)与 Ducan 多重比较, $P < 0.05$ 认为有显著性统计差异。

2 结果

2.1 GnRH2 全长 cDNA 克隆及序列分析

如图 1 所示, 半滑舌鲷 GnRH2 全长 cDNA 为 538 bp (不包括 poly A 尾), 其中, 5′非编码区(Untranslated region, UTR)为 154 bp, 3′UTR 为 126 bp, 开放阅读框(Open reading frame, ORF)为 258 bp, 编码 85 个氨基酸(GenBank 登录号: KX090947)。GnRH2 前体多肽由 4 部分组成: 信号肽(23 个氨基酸)、GnRH2 十肽(QHWSHGWYPG)、酶切位点(GKR)以及 GnRH 相关肽(49 个氨基酸)。

2.2 GnRH2 同源性比对与进化树分析

如图 2 所示, 将半滑舌鲷 GnRH2 前体与其他硬骨鱼类进行同源性比对分析, 发现 GnRH2 在鱼类中同源性极高, 尤其是十肽(QHWSHGWYPG)在所有硬骨鱼类中完全相同。半滑舌鲷 GnRH2 与鲈形目同源性最高(89.41%–90.59%), 其次为鲾形目、鲑形目和鲟形目(78.82%–85.88%), 与鲤形目同源性最低(61.18%–71.76%)。

采用 Mega 6.06 软件, 基于 GnRH 前体氨基酸序列比对分析结果, 以邻近法构建鱼类 GnRH 进化树。如图 3 所示, 进化树共分为 3 大支: GnRH1 分支、GnRH2 分支以及 GnRH3 分支。本研究克隆所得半滑舌鲷 GnRH2 与其他鱼类 GnRH2 聚为一支。

2.3 gnrh2 mRNA 组织分布及在卵巢成熟过程中表达分析

如图 4 所示, gnrh2 mRNA 主要在脑中表达, 在

```

-154                                tgggggagcgtgaggaggaatctgaactggagaa
-120 ctgctaagaaaccataaagacaataagagtgtctgagagc tctgaggagacgctgagga
-60  aaacat taagaagcccctggtgataaagtgtgagcagcactaggtacagacatatc
  1  ATCAGTGTGTTTCGGCTGGTCTGCTGCGGGTGCTTCCTGCTGCGTTGGGCTCAATTT
  1  M S V F R L V L L L G L L L C L G A Q F
                                Signal peptide
  61 TCTAATGCACAGCACTGGTCTCATGGTGGTACCCAGGAGGAAAAAGGGAGCTGGACTCC
  21 S N A Q H W S H G W Y P G G K R E L D S
                                GnRH2
  121 TTTGGTACATCAGAGATTCAGAGGAGATTAACCTCTGTGAGCGCGGAAATGCAATTA
  41 F G T S E I S E E I K L C E A G E C S Y
                                GnRH-associated peptide
  181 CTGAGACCCCAGAGAGGAGCATTCGAAAGACATTA TACTCGATGCGTTGGCCCGGGAG
  61 L R P Q R R S I L K D I I L D A L A R E

  241 CTACAGAAGGAAGTGAaacgttctgttttctatgtgtatcctccagtgtaactgtt
  81 L Q K R K *
  301 ttgatggtgtgaatttggtgtatcgtatgtgaaatgtattaactcgttggtttaaatt
  361 tcccataataaacaatttgattt-polyA
  
```

图 1 半滑舌鲷 GnRH2 前体 cDNA 核苷酸序列与推测的氨基酸序列

Fig.1 The nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of cDNA encoding the GnRH2 precursor of *C. semilaevis*

开放阅读框用大写字母表示, 5′和 3′非编码区用小写字母表示。起始密码子和终止密码子分别用黑框和星号表示; 下划实线为信号肽序列; 下划实线且粗体字母为 GnRH2 十肽; 下划虚线为 GnRH 相关肽

The ORF was denoted by capital letters, and the 5′- and 3′-UTRs were denoted by lower-case letters. The initiation codon was boxed, and the stop codon was denoted by an asterisk. The signal peptide was underlined with a solid line. GnRH2 decapeptide was highlighted in bold letters and underlined with a solid line. The GnRH-associated peptide was underlined with a dotted line

垂体及其他外周组织中表达量很低, 只有脑中表达量的 2.5%–8.3%。

如图 5 所示, 根据卵母细胞不同发育时相, 以各期切片视野中数量或者面积占优势的卵母细胞类型作为卵巢划分依据, 卵巢发育周期共分为 5 个时期: 时期 II, 卵黄生成前期; 时期 III, 卵黄生成期; 时期 IV, 卵黄生成后期; 时期 V, 成熟期; 时期 VI, 排卵后期。

如图 6-A 所示, 以 II 期作为参照, 在卵巢成熟过程中, 脑 gnrh2 mRNA 表达量在卵黄生成期(III期)显著性增加, 达到峰值; 随后, 脑 gnrh2 mRNA 表达量急剧下降, 在成熟期(V期)达到最小值; 然而, 在排卵后期(VI期)又显著性增加。如图 6-B 所示, 以 II 期作为参照, 在卵巢成熟过程中垂体 gnrh2 mRNA 表达量在卵黄生成期(III期)略微降低, 与 II 期相比无显著性差异; 然而, 垂体 gnrh2 mRNA 表达量在卵黄生成后期(IV期)显著性降低; 随后, 垂体 gnrh2 mRNA 表达量在成熟期(V期)较IV期显著性增加, 在排卵后期(VI期)又急剧下降。

	Signal peptide	GnRH2	GnRH-associated peptide
Tongue sole	M-SVFRLLVLLGLLLCLGAQFSNA	QHWSHGWYPG	GKRELDSEFGTSEISEEIKLCEAGECSYLRPQRRSILKDIILDALARELQKRK
Grass puffer	M-RVPGLLLLLGLLLCAGAHLSNG	QHWSHGWYPG	GKRELDSEFGTSEISEEIKLCEAGECSYLRPQRRNVLRNIFLLDALTRELQKRK
Winter flounder	M-CASRLVLLGLLLCVGAQLSSG	QHWSHGWYPG	GKRELDSEFGTSEISEEIKLCEAGECSYLRPQRRNLRNILLDALARELQKRK
Grouper	M-CVSRLVLLGLLLCVGAQLSSA	QHWSHGWYPG	GKRELDSEFGTSEISEEIKLCEAGECSYLRPQRRSILRNIILEALARELQKRK
Nile tilapia	M-CVSRLVLLGLLLCVGAQLSFA	QHWSHGWYPG	GKRELDSEFGTSEISEEIKLCEAGECSYLRPQRRSILRNILLDALARELQKRK
Chub mackerel	M-CVSRLVLLGLLLCVGAQLSNA	QHWSHGWYPG	GKRELDSEFGTSEISEEIKLCEAGECSYLRPQRRSFLRNILLDALARELQKRK
Black porgy	M-CVSRLVLLGLLLCVGAQLSNG	QHWSHGWYPG	GKRELDSEFGTSEISEEIKLCEAGECSYLRPQRRSVLRNILLDALARELQKRK
European sea bass	M-CVSRLVLLFGLLLCVGAQLSNA	QHWSHGWYPG	GKRELDSEFGTSEISEEIKLCEAGECSYLRPQRRSVLRNILLDALARELQKRK
Goldfish	MVHICRLFFVVMGLMFLSVQFAS	QHWSHGWYPG	GKRELDVYDPSEVSEI KLCNAGKCSFLIPQGRNLIKTIILLDALTRDFQKRK
Zebrafish	MVLVCRLLLVGLMLCLSAQLSSA	QHWSHGWYPG	GKRELDLYDTSEVSEV KLCCEAGKCSYLRPQGRNLIKTIILLDALIRDFQKRK
Rainbow trout	MVSVARLVFMLGLLLCLGAQLSSA	QHWSHGWYPG	GKRELDSEFGTSEISEEIKLCEAGECSYLRPQRRNLRNIVLIDALARELQKRK

*: * ..*::: ..::: .*****:* : *::*:*:*:*:*:*: * * *..* : .*:** *::**

图 2 不同硬骨鱼类 GnRH2 前体氨基酸序列比对

Fig.2 Multiple amino acid sequence alignments of GnRH2 precursors from different fish species

相同的氨基酸用(*)标识; 高度保守的氨基酸用(:)标识; 低度保守的氨基酸用(.)标识。GenBank 登录号分别为: 半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*; ANW83256)、星点东方鲀(*Takifugu niphobles*; BAJ07189)、美洲拟鲈(*Pseudopleuronectes americanus*; AER93392)、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*; ACZ51152)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*; BAC65155)、鲈鱼(*Scomber japonicus*; ADP89592)、黑鲷(*Acanthopagrus schlegeli*; ABU92552)、欧洲海鲈(*Dicentrarchus labrax*; AAF62900)、金鱼 (*Carassius auratus*; AAB86989)、斑马鱼(*Danio rerio*; AAM43951)以及虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*; AAF08687)

The identical amino acids were labeled with “*”, the highly conserved amino acids were labeled with “:”, and the less conserved amino acids were labeled with “.”. The GenBank accession numbers of the GnRH2 precursor sequences of teleosts were as follows: half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*; ANW83256), grass puffer (*Takifugu niphobles*; BAJ07189), winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*; AER93392), orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*; ACZ51152), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*; BAC65155), chub mackerel (*Scomber japonicus*; ADP89592), black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*; ABU92552), European sea bass (*Dicentrarchus labrax*; AAF62900), goldfish (*Carassius auratus*; AAB86989), zebrafish (*Danio rerio*; AAM43951), and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*; AAF08687)

3 讨论

本研究首先通过 RT-PCR 及 RACE 方法获得了半滑舌鲷 GnRH2 全长 cDNA 序列。进化分析表明, 半滑舌鲷 GnRH2 与其他硬骨鱼类 GnRH2 聚为一支, 不同于 GnRH1 和 GnRH3 分支。多重序列比对发现, 鱼类 GnRH2 前体序列高度保守, 由信号肽、成熟十肽、酶切位点以及 GnRH 相关肽组成, 尤其是成熟十肽在所有硬骨鱼类中完全相同。此外, 半滑舌鲷 *gnrh2* mRNA 主要在脑中表达, 以及在卵巢成熟过程中脑中 *gnrh2* mRNA 表达量的动态变化, 表明脑 GnRH2 可能参与了半滑舌鲷性腺发育。该结果增加了对 GnRH2 参与鱼类生殖调控作用的认识。

半滑舌鲷 GnRH2 ORF 为 258 bp, 编码 85 个氨基酸的前体多肽(图 1), 这与黑鲷(An *et al*, 2008)、小丑鱼(Kim *et al*, 2012)、星点东方鲀(Shahjahan *et al*, 2010)、鲈鱼(Selvaraj *et al*, 2012)、三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*) (Shao *et al*, 2015)、美洲拟鲈(Tuziak *et al*, 2013a)、美洲黑石斑(Morin *et al*, 2015)等结果是一致的。不同鱼类 GnRH2 前体多肽氨基酸长度略有差异, 例如底鳉(*Fundulus heteroclitus*)、中华鲟(*Acipenser*

sinensis)、大西洋鲑 GnRH2 前体分别为 83 个氨基酸、86 个氨基酸、86 个氨基酸(Hildahl *et al*, 2011; Ohkubo *et al*, 2010; Yue *et al*, 2013)。不同硬骨鱼类 GnRH2 前体同源性比对分析显示, GnRH2 在进化中高度保守, 半滑舌鲷 GnRH2 与鲈形目同源性最高, 其次为鲈形目、鲑形目和鲑形目, 与鲤形目同源性最低(图 2)。进化树分析进一步证实, 本研究克隆所得序列确实为半滑舌鲷 GnRH2 序列。此外, GnRH 进化树分为 3 大支也表明 3 种 GnRH 序列在硬骨鱼类进化中高度保守(图 3), 暗示 3 种 GnRH 多肽可能发挥了重要的生理功能。

为了研究 GnRH2 潜在的生理功能, 本研究对其组织表达模式进行了分析。荧光定量 PCR 结果显示, 半滑舌鲷 *gnrh2* mRNA 主要在脑中表达, 在垂体及其他外周组织中表达量极低, 只有脑中表达量的 2.5%–8.3% (图 4)。与之类似, 圆斑星鲈 *gnrh2* mRNA 只在脑中表达(Xu *et al*, 2012)。除了主要在脑中表达外, *gnrh2* mRNA 在不同鱼类外周组织中表达有所差异, 在底鳉肾(Ohkubo *et al*, 2010)、中华鲟垂体(Yue *et al*, 2013)、美洲拟鲈精巢(Tuziak *et al*, 2013a)、大西洋鲑卵巢(Hildahl *et al*, 2011)、精巢和脾(Tuziak *et al*, 2013b)等组织中也有少量表达。综上所述, GnRH2

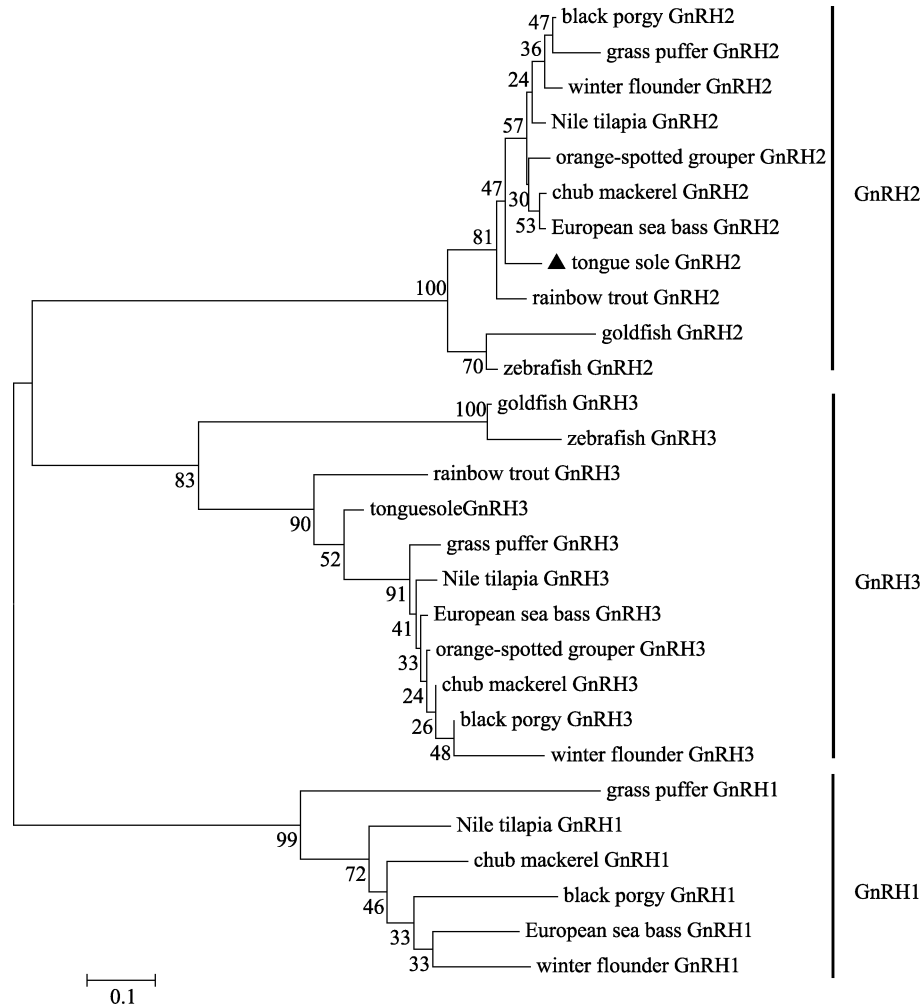


图 3 不同硬骨鱼类 GnRH 前体进化树分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of GnRH precursors from different teleosts

鱼类 GnRH1、GnRH2 以及 GnRH3 的 GenBank 登录号分别为：半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*; ANW83256/AFP23141)、星点东方鲀(*Takifugu niphobles*; BAJ07188/BAJ07189/BAJ07190)、美洲拟鲈(*Pseudopleuronectes americanus*; AER93394/AER93392/AER93395)、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*; ACZ51152/ACZ51151)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*; BAC65154/BAC65155/BAC65156)、鲈鱼(*Scomber japonicus*; ADP89591/ADP89592/ADP89593)、黑鲷(*Acanthopagrus schlegeli*; ABU92553/ABU92552/ABV03808)、欧洲海鲈(*Dicentrarchus labrax*; AAF62898/AAF62900/AAF62899)、金鱼(*Carassius auratus*; AAB86989/BAB18904)、斑马鱼(*Danio rerio*; AAM43951/AAL99294)以及虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*; AAF08687/AAF91280)

The GenBank accession numbers of GnRH1, GnRH2 and GnRH3 precursor sequences of teleosts were as follows: half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*; ANW83256/AFP23141), grass puffer (*Takifugu niphobles*; BAJ07188/BAJ07189/BAJ07190), winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*; AER93394/AER93392/AER93395), orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*; ACZ51152/ACZ51151), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*; BAC65154/BAC65155/BAC65156), chub mackerel (*Scomber japonicus*; ADP89591/ADP89592/ADP89593), black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*; ABU92553/ABU92552/ABV03808), European sea bass (*Dicentrarchus labrax*; AAF62898/AAF62900/AAF62899), goldfish (*Carassius auratus*; AAB86989/BAB18904), zebrafish (*Danio rerio*; AAM43951/AAL99294) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*; AAF08687/AAF91280)

主要由脑分泌进而作用于垂体发挥其生理功能。此外，通过免疫细胞化学方法在金鱼及尼罗尖吻鲈(*Lates niloticus*)脑和垂体中均检测到了 GnRH2 的阳性信号(Kim *et al*, 1995; Mousa *et al*, 2003)。

尽管 GnRH2 在进化过程中高度保守，但其生理

学功能研究较少。在金鱼中，侧脑室注射 GnRH2 直接影响了雌鱼生殖行为(Volkoff *et al*, 1999)，抑制了金鱼的摄食行为(Matsuda *et al*, 2008)。此外，GnRH2 促进了金鱼垂体 LH 及 GH 分泌(Chang *et al*, 2012、2009)。然而，GnRH2 在鱼类生殖调控中的作用仍不

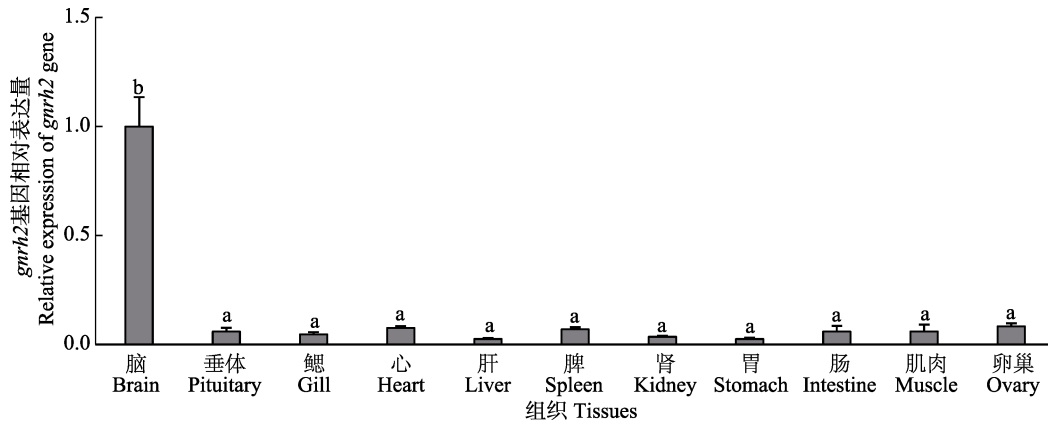


图 4 半滑舌鳎 *gnrh2* mRNA 组织分布

Fig.4 Relative mRNA levels of *gnrh2* in various tissues of *C. semilaevis*

图中不同字母表示不同组之间有显著性差异, 下同

Groups with different letters are significantly different from each other, the same as below

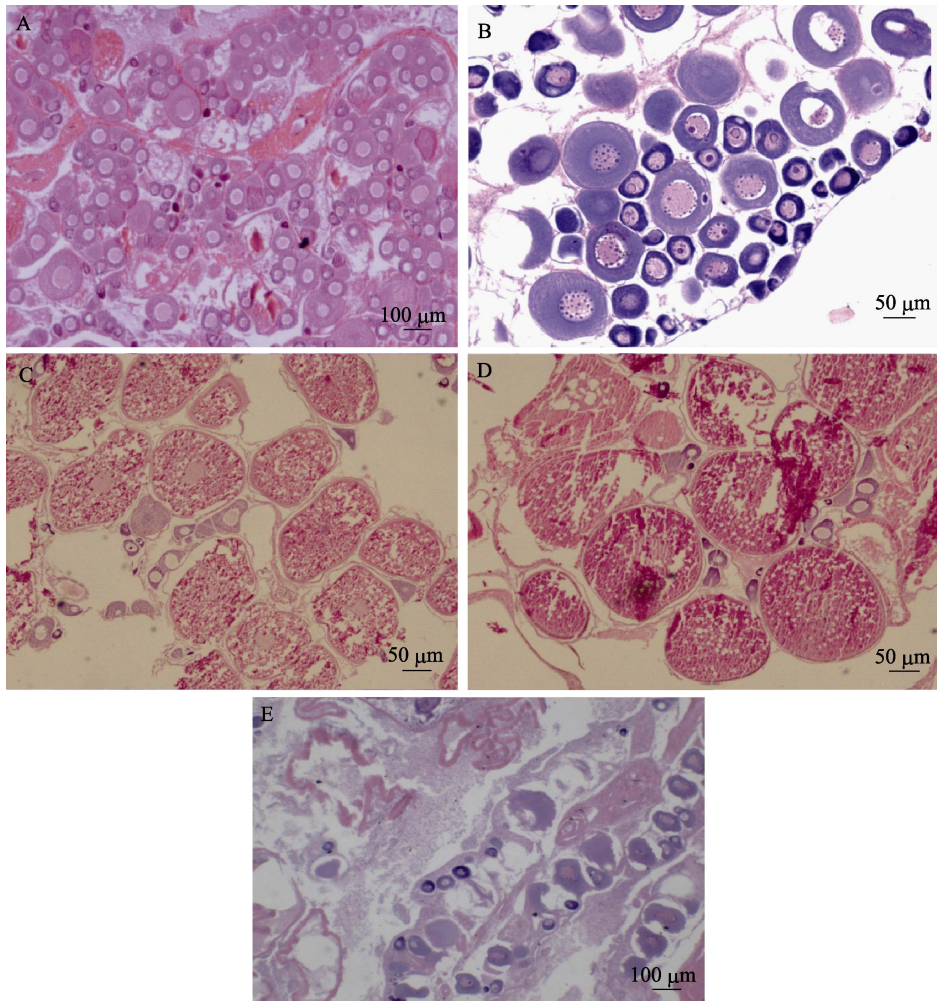


图 5 半滑舌鳎卵巢发育时期组织切片

Fig.5 Histological sections of *C. semilaevis* ovaries at different stages of development

A. II期卵巢; B. III期卵巢; C. IV期卵巢; D. V期卵巢; E. VI期卵巢. 比例尺: 100 μm (A 和 E); 50 μm (B、C 和 D)
 A. Ovaries at stage II; B. Ovaries at stage III; C. Ovaries at stage IV; D. Ovaries at stage V; E. Ovaries at stage VI.
 Scale bar: 100 μm (A, E); 50 μm (B, C, and D)

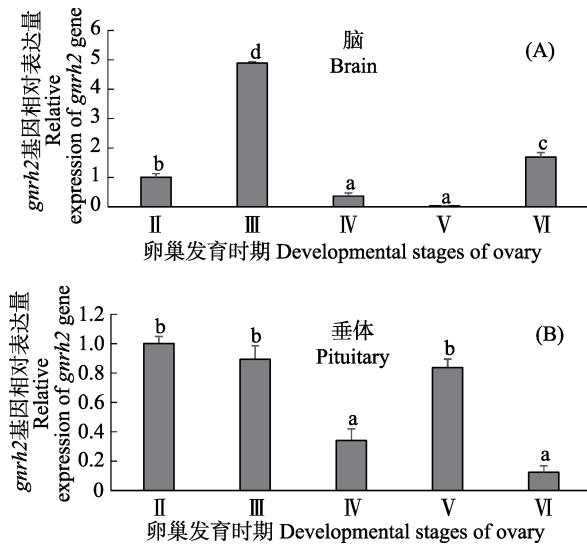


图6 半滑舌鲷卵巢不同发育时期脑(A)和垂体(B)中 *gnrh2* mRNA 表达分析

Fig.6 Expression profiles of *gnrh2* mRNA in the brain (A) and pituitary (B) during ovarian maturation of *C. semilaevus*

清楚,需要进一步深入研究。本研究中,半滑舌鲷脑 *gnrh2* mRNA 在卵黄生成期(III期)显著性增加,达到峰值;随后表达量急剧下降,在成熟期(V期)达到最小值;在排卵后期(VI期)又显著性增加。与此同时,垂体 FSH β 和 LH β 也在III期显著性增加,分别在IV期和V期达到峰值(Shi *et al.*, 2015)。因为 FSH 在早期性腺复苏和配子发育过程中起了主要作用,而 LH 在最后性成熟过程中发挥了重要作用(Shahjahan *et al.*, 2010),因此, GnRH2 可能通过促进垂体 FSH 和 LH 合成与分泌的方式在半滑舌鲷卵巢发育中发挥了重要作用。此外,半滑舌鲷为非同步分批多次产卵型鱼类,脑 *gnrh2* mRNA 水平在排卵后期(VI期)显著性增加,有可能是为下一次卵巢发育做准备。与之类似,星点东方鲀脑 *gnrh2* mRNA 表达量也在排卵后期有所增加(Shahjahan *et al.*, 2010)。

为了进一步研究垂体 GnRH2 是否参与半滑舌鲷卵巢发育,对半滑舌鲷卵巢成熟过程中垂体 *gnrh2* mRNA 表达差异也进行了分析。在半滑舌鲷卵巢成熟过程中,垂体 *gnrh2* mRNA 表达量除在成熟期(V期)相对有所增加外,随着卵巢发育垂体 *gnrh2* mRNA 表达量显著降低,这说明垂体 GnRH2 多肽可能没有参与卵巢发育。与之类似,鲑鱼垂体 GnRH2 多肽水平在卵巢成熟过程中没有发生显著性变化(Selvaraj *et al.*, 2012)。在条纹鲈(*Morone saxatilis*)、金头鲷(*Sparus aurata*)及真鲷(*Pagrus major*)垂体中不表达 *gnrh2* 或者 GnRH2 含量不随着生殖状况的变化而变化,进一

步证实了上述结论(Xu *et al.*, 2012)。此外,半滑舌鲷垂体 *gnrh2* mRNA 表达量随卵巢发育降低,可能是由于受到垂体 FSH/LH 负反馈作用导致的,然而这一推断需要进一步深入研究。

4 小结

本研究获得了半滑舌鲷 GnRH2 的全长 cDNA 序列,并对其系统进化、基因组织分布及卵巢成熟过程中的时空表达特性进行了分析。进化分析表明,半滑舌鲷 GnRH2 与其他硬骨鱼类 GnRH2 聚为一支,不同于 GnRH1 和 GnRH3 分支。多重序列比对发现,鱼类 GnRH2 前体序列高度保守,荧光定量 PCR 结果表明, *gnrh2* mRNA 主要在脑中表达。此外,卵巢成熟过程中脑 *gnrh2* mRNA 表达量的动态变化,暗示脑 GnRH2 可能参与了半滑舌鲷性腺发育。该结果增加了对 GnRH2 参与鱼类生殖调控作用的认识。

参 考 文 献

- An KW, Nelson ER, Habibi HR, *et al.* Molecular characterization and expression of three GnRH forms mRNA during gonad sex-change process, and effect of GnRH α on GTH subunits mRNA in the protandrous black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*). *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 159(1): 38–45
- Andersson E, Fjellidal PG, Klenke U, *et al.* Three forms of GnRH in the brain and pituitary of the turbot, *Scophthalmus maximus*: Immunological characterization and seasonal variation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 129(2–3): 551–558
- Breton TS, DiMaggio MA, Sower SA, *et al.* Brain aromatase (*cyp19a1b*) and gonadotropin releasing hormone (*gnrh2* and *gnrh3*) expression during reproductive development and sex change in black sea bass (*Centropristis striata*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 2015, 181: 45–53
- Chang JP, Habibi HR, Yu Y, *et al.* Calcium and other signalling pathways in neuroendocrine regulation of somatotrophic functions. *Cell Calcium*, 2012, 51(3–4): 240–252
- Chang JP, Johnson JD, Sawisky GR, *et al.* Signal transduction in multifactorial neuroendocrine control of gonadotropin secretion and synthesis in teleosts—studies on the goldfish model. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 161(1): 42–52
- Guilgur L, Strüssmann C, Somoza G. mRNA expression of GnRH variants and receptors in the brain, pituitary and ovaries of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) in relation to

- the reproductive status. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2009, 35(1): 157–166
- Guilgur LG, Moncaut NP, Canario AV, *et al.* Evolution of GnRH ligands and receptors in gnathostomata. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2006, 144(3): 272–283
- Hildahl J, Sandvik GK, Edvardsen RB, *et al.* Identification and gene expression analysis of three GnRH genes in female Atlantic cod during puberty provides insight into GnRH variant gene loss in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 2011, 172(3): 458–467
- Kim MH, Oka Y, Amano M, *et al.* Immunocytochemical localization of sGnRH and cGnRH-II in the brain of goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of Comparative Neurology*, 1995, 356(1): 72–82
- Kim NN, Shin HS, Habibi HR, *et al.* Expression profiles of three types of GnRH during sex-change in the protandrous cinnamon clownfish, *Amphiprion melanopus*: Effects of exogenous GnRHs. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 161(2): 124–133
- Liu XZ, Shi B, Li XX, *et al.* Molecular characterization of the novel membrane progesterin receptor gene and its role during ovarian development in the half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(4): 608–619 [柳学周, 史宝, 李晓晓, 等. 半滑舌鲷新型膜孕激素受体基因分子特征及其在卵巢发育过程的作用. *中国水产科学*, 2015, 22(4): 608–619]
- Liu XZ, Xu YJ, Liu NZ, *et al.* Study on histological and morphometric characters of gonad development of *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(6): 25–35 [柳学周, 徐永江, 刘乃真, 等. 半滑舌鲷卵巢发育的组织学和形态数量特征研究. *渔业科学进展*, 2009, 30(6): 25–35]
- Mousa MA, Mousa SA. Immunohistochemical localization of gonadotropin releasing hormones in the brain and pituitary gland of the Nile perch, *Lates niloticus* (Teleostei, Centropomidae). *General and Comparative Endocrinology*, 2003, 130(3): 245–255
- Matsuda K, Nakamura K, Shimakura S, *et al.* Inhibitory effect of chicken gonadotropin-releasing hormone II on food intake in the goldfish, *Carassius auratus*. *Hormones and Behavior*, 2008, 54(1): 83–89
- Morin SJ, Decatur WA, Breton TS, *et al.* Identification and expression of GnRH2 and GnRH3 in the black sea bass (*Centropristis striata*), a hermaphroditic teleost. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2015, 41(2): 383–395
- Nocillado JN, Levavi-Sivan B, Carrick F, *et al.* Temporal expression of G-protein-coupled receptor 54 (GPR54), gonadotropin-releasing hormones (GnRH), and dopamine receptor D2 (*drd2*) in pubertal female grey mullet, *Mugil cephalus*. *General and Comparative Endocrinology*, 2007, 150(2): 278–287
- Ohkubo M, Aranishi F, Shimizu A. Molecular cloning and brain distribution of three types of gonadotropin-releasing hormone from mummichog *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Fish Biology*, 2010, 76(2): 379–394
- Selvaraj S, Kitano H, Amano M, *et al.* Molecular characterization and expression profiles of three GnRH forms in the brain and pituitary of adult chub mackerel (*Scomber japonicus*) maintained in captivity. *Aquaculture*, 2012, 356–357(4): 200–210
- Selvaraj S, Kitano H, Ohga H, *et al.* Expression changes of mRNAs encoding kisspeptins and their receptors and gonadotropin-releasing hormones during early development and gonadal sex differentiation periods in the brain of chub mackerel (*Scomber japonicus*). *General and Comparative Endocrinology*, 2015, 222: 20–32
- Shahjahan M, Hamabata T, Motohashi E, *et al.* Differential expression of three types of gonadotropin-releasing hormone genes during the spawning season in grass puffer, *Takifugu niphobles*. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 167(1): 153–163
- Shao YT, Tseng YC, Chang CH, *et al.* GnRH mRNA levels in male three-spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*, under different reproductive conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2015, 180: 6–17
- Shi B, Liu X, Xu Y, *et al.* Molecular characterization of three gonadotropin subunits and their expression patterns during ovarian maturation in *Cynoglossus semilaevis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(2): 2767–2793
- Tuziak SM, Volkoff H. Gonadotrophin-releasing hormone in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*): Molecular characterization, distribution and effects of fasting. *General and Comparative Endocrinology*, 2013a, 184(3): 9–21
- Tuziak SM, Volkoff H. Melanin-concentrating hormone (MCH) and gonadotropin-releasing hormones (GnRH) in Atlantic cod, *Gadus morhua*: Tissue distributions, early ontogeny and effects of fasting. *Peptides*, 2013b, 50(3): 109–118
- Volkoff H, Peter RE. Actions of two forms of gonadotropin releasing hormone and a GnRH antagonist on spawning behavior of the goldfish *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology*, 1999, 116(3): 347–355
- Wang B, Jia J, Yang G, *et al.* *In vitro* effects of somatostatin on the growth hormone-insulin-like growth factor axis in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 237: 1–9
- Xu YJ, Liu XZ, Liao MJ, *et al.* Molecular cloning and differential expression of three GnRH genes during ovarian maturation of spotted halibut, *Verasper variegatus*. *Journal of Experimental Zoology, Part A, Ecological Genetics and Physiology*, 2012, 317(7): 434–446

Yue H, Ye H, Chen X, *et al.* Molecular cloning of cDNA of gonadotropin-releasing hormones in the Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) and the effect of 17 beta-estradiol on

gene expression. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 2013, 166(4): 529–537

(编辑 冯小花)

Molecular Cloning, Localization, and Expression Analysis of *gnrh2* in Different Tissues of Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*) During Ovarian Maturation

WANG Bin^{1,2}, LIU Xuezhou^{1,2}①, LIU Quan^{1,3}, ZHAO Ming¹, XU Yongjiang^{1,2}, SHI Bao^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract In order to clarify the physiological roles of gonadotropin-releasing hormone 2 (GnRH2) during ovarian maturation in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*), we first cloned the full-length cDNA of GnRH2 by RT-PCR coupled with RACE. Then, the tissue distribution and changes in *gnrh2* mRNA levels during ovarian maturation were evaluated by real-time quantitative PCR. Our data showed that the full-length cDNA of GnRH2 was 538 bp in size, excluding the poly-A tail. It consisted of a 5' untranslated region (UTR) of 154 bp, a 3' UTR of 126 bp and an open reading frame (ORF) of 258 bp which encoded an 85-amino acids preprohormone with a deduced molecular mass and isoelectric point of 9.69 kDa and 8.55, respectively. GnRH2 precursor contained a signal peptide, a mature decapeptide, a processing site, and a GnRH-associated peptide. Multiple sequence alignments indicated that GnRH2 preprohormones were highly conserved among teleosts, especially the decapeptide (QHWSHGWYPG) motif. Tongue sole GnRH2 precursor displayed the highest sequence identities with the order Perciformes (89.41%–90.59%), followed by Pleuronectiformes, Salmoniformes, and Tetraodontiformes (78.82%–85.88%), and the lowest sequence identities with Cypriniformes (61.18%–71.76%). The tissue distribution showed that *gnrh2* transcripts could be detected at the highest levels in the brain and at lower levels in the pituitary and other peripheral tissues. The developmental stages of ovaries were divided into five stages (II, III, IV, V, and VI) by histological analysis and the expression patterns of *gnrh2* mRNA during ovarian maturation were also investigated. In the brain, the mRNA expression of *gnrh2* peaked at stage III, declined sharply at stage IV and reached a minimum at stage V. However, the brain *gnrh2* mRNA levels ascended again at stage VI. The pituitary *gnrh2* mRNA levels declined gradually, except for a temporary increase at stage V. These data indicate that brain GnRH2 appears to be involved in ovarian maturation in the half-smooth tongue sole, and this study extends our knowledge of the roles of GnRH2 on the regulation of reproduction in fish.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; GnRH2; Gene cloning and expression; Ovarian maturation

① Corresponding author: LIU Xuezhou, Email: liuxz@ysfri.ac.cn

DOI: 10.11758/yykxjz.20160816003

http://www.yykxjz.cn/

GH/IGF- I 轴对半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*) 卵巢发育的调控作用*

徐永江^{1,2} 柳学周^{1,2①} 石 莹³ 王 滨^{1,2}
史 宝^{1,2} 张 凯⁴ 蓝功岗⁴



(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室
海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 青岛市渔业技术推广站 青岛 266071;
4. 青岛贝宝海洋科技有限公司 青岛 266400)

摘要 为深入认识半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)生殖调控机制,研究了生长轴(GH/IGF- I axis)对半滑舌鲷卵巢发育调控的作用及可能机制;分析了卵巢不同发育时期垂体中的生长激素(GH),脑、性腺和肝脏中的类胰岛素生长因子 I (IGF- I) mRNA 的表达水平变化;检测了卵巢不同发育期,血清 GH、IGF- I、雌二醇(E2)、睾酮(T)的表达水平变化,并分析了生长因子与性腺指数(GSI)、E2 和 T 表达变化的关系。结果显示,垂体 GH mRNA 表达水平在Ⅳ期卵巢时显著升高,至Ⅴ期时达峰值,随后(Ⅵ期)显著降低,垂体 GH mRNA 表达水平与 GSI、血清 GH 与 IGF- I 表达水平呈显著正相关。血清 GH 与垂体 GH mRNA 表达水平表现出相似的变化趋势。肝脏 IGF- I mRNA 表达水平在Ⅳ期和Ⅴ期卵巢时较低,但Ⅵ期时又显著升高,其与脑 IGF- I mRNA 及血清 IGF- I 表达水平呈显著正相关,而与血清 E2 和 T 表达水平呈显著负相关。脑 IGF- I mRNA 表达水平自Ⅱ期卵巢开始显著升高,至Ⅳ期时达峰值,并与血清 IGF- I 表达水平呈显著负相关。卵巢 IGF- I mRNA 表达水平自Ⅱ期开始显著升高,并在Ⅳ期时达峰值,但在Ⅴ期时明显下降,并保持至Ⅵ期,与血清 E2 表达水平呈显著正相关,而与血清 IGF- I 表达水平呈显著负相关。血清 IGF- I 变化趋势与肝脏 IGF- I mRNA 相似。结果揭示了 GH、IGF- I 在转录和血清水平上以协同或者拮抗的方式共同参与了半滑舌鲷卵巢发育的过程,其作用途径可能与性类固醇激素的合成与分泌有关,表明 GH/IGF- I 轴对卵巢发育具有重要的调控作用,为深入认识半滑舌鲷卵巢发育的调控机制提供了新的思路和素材。

关键词 半滑舌鲷; 生长激素(GH); 类胰岛素生长因子 I (IGF- I); 卵巢发育; 调控机制

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0073-08

鱼类的生殖是一个配子分裂、生长、发育、最终成熟并通过结合形成胚胎的过程,性腺是主要的生殖器官,其发育、成熟及生殖行为受到遗传特性和外部

环境条件的双重调控,主要是通过生殖轴(下丘脑-垂体-性腺,HPG axis)来实现的(雷霖霖,2005;林浩然,2011)。众所周知,鱼类的生长过程是受生长轴[生长

* 国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50)和国家自然科学基金(31502145; 31602133)共同资助 [This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-50) and the National Natural Science Foundation of China (31502145; 31602133)].
徐永江, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-08-16, 收修改稿日期: 2016-09-11

激素(GH)/类胰岛素生长因子 I (IGF- I)轴, GH/IGF- I axis]调控的。其中, GH 和 IGF- I 是 2 个关键的生长因子, 调控机体的生长、代谢和能量平衡内稳态(Reinecke *et al*, 2005)。鱼类的生殖功能与生长性能紧密联系、协同作用, 它们同时受诸多神经内分泌调控因子的级联调控, 生殖调控因子[如促性腺激素释放激素(GnRH)、促性腺激素(FSH, LH)、kisspeptin 等]与生长因子[如 GH、IGFs 等]共同调控鱼类配子的生长发育(Campbell *et al*, 2006; 林浩然, 2000)。作为重要的生长调控因子, GH 及其受体可通过与 GnRH、FSH、雌激素受体(ER)等生殖因子作用, 促进配子生长发育和成熟(Kajimura *et al*, 2004; Campbell *et al*, 2006; Benedet *et al*, 2010)。另外, 类胰岛素生长因子(IGFs)在鱼类卵巢生长发育中同样起着重要的调控作用(Reinecke, 2010), 特别是 IGF3, 只在卵巢中特异性表达(Berishvili *et al*, 2010), 表明其是卵巢发育不可或缺的关键因子。可见, 鱼类的性腺发育过程受到生殖功能因子和生长因子的协同调控作用, 从而使得配子最终达到成熟和排放。

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)为我国鲆鲽类三大主导养殖种类之一, 2003 年伴随着其自然产卵调控和苗种培育关键技术的突破, 半滑舌鳎养殖业迅速发展, 目前已在全国形成较大的养殖产业规模(柳学周等, 2014)。随着养殖产业的快速发展, 诸如亲鱼性腺成熟不良、产卵效率下降、人工亲鱼性早熟等问题不断凸显, 制约了养殖业的可持续发展。针对这些现象, 我国学者已经围绕半滑舌鳎生殖调控机制开展相关研究, 在 GnRH (Zhou *et al*, 2012)、FSH、LH、mPR α 及其受体(陈晓燕等, 2011; 李晓晓等, 2013; 史宝等, 2013; Shi *et al*, 2015; 柳学周等, 2015)等生殖功能因子对性腺发育调控的生理功能及作用机制方面取得了诸多进展, 但目前对半滑舌鳎生殖调控机制认识仍显不足。近年来, 在养殖生产中, 雌性亲鱼卵巢发育不佳、配子无法最终成熟、无法形成自然产卵等仍是制约苗种生产的关键因素, 而亲鱼及配子生长调控的不足可能是导致配子无法最终成熟和自然产卵的重要原因之一。因此, 为了探讨半滑舌鳎性腺生长发育与生殖的关系, 作者研究了 GH 和 IGF- I 对卵巢发育和成熟的调控作用, 并对其可能的机制进行了探讨, 以期全面和深入揭示半滑舌鳎生殖调控机制提供新的思路 and 基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验鱼与生殖调控

实验用半滑舌鳎亲鱼来自青岛某养殖公司, 为人

工培育条件下达性成熟年龄(3 龄以上)的雌性亲鱼。亲鱼全长为 42–57 cm, 体重为 1450–2630 g。

亲鱼在室内水泥池(面积为 25 m²)培育, 使用砂滤海水, 周年培育水温为 10–25℃, 盐度为 27–31, pH 为 7.8–8.2, 溶解氧>5 mg/L, 日换水率为 300%–500%。亲鱼饵料为活沙蚕、贝肉, 日投喂 2 次, 投喂量为鱼体重的 2%–3%, 及时清除残饵、排污。繁殖周期到来前 2 个月, 开始对亲鱼进行水温和光周期调控(徐永江等, 2011), 同时进行亲鱼营养强化, 促进亲鱼性腺发育成熟。经过 70 d 的人工调控, 亲鱼性腺发育成熟并最终自然产卵。

1.2 实验鱼取样

亲鱼培育和人工调控过程中, 在卵巢发育的不同阶段进行取样, 每次取样 3–4 尾亲鱼。实验鱼以 MS-222 麻醉(300 mg/L)后取血, 血液以 15000 r/min 离心 5 min, 分离血清, 于–40℃保存, 用于血清中雌二醇(E2)、睾酮(T)、GH 及 IGF- I 表达水平的测定。实验鱼逐尾采集血液后, 取出脑、垂体、卵巢和肝脏组织, 液氮速冻后转入–80℃保存, 用于总 RNA 提取。

卵巢组织以 Davison 固定液固定后, 通过组织切片观察判定发育期, 按照柳学周等(2009)建立的半滑舌鳎卵巢发育期判别方法判定。称重卵巢, 计算性腺发育指数(GSI):

性腺发育指数(GSI)=性腺重量/(体重–内脏重)(Xu *et al*, 2012)。

1.3 基因的实时荧光定量 PCR 检测

取不同卵巢发育时期的组织样品(3 尾亲鱼), 用 RNAiso Plus (TaKaRa, 日本)分别抽提脑、垂体、卵巢和肝脏的总 RNA, 测定浓度和质量。选择高质量总 RNA 以 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒(TaKaRa, 日本)合成用于实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR)的 cDNA 第 1 链, 操作按照试剂盒说明书进行。

利用 qRT-PCR 方法检测不同卵巢发育期垂体 GH mRNA 以及脑、肝脏、卵巢中 IGF- I mRNA 表达水平的变化。根据半滑舌鳎 GH (GenBank Accession No.: FJ608663)和 IGF- I (GenBank Accession No.: HQ334201)序列和 18S rRNA 序列设计定量 PCR 引物(表 1)。

qRT-PCR 反应使用 SYBR Premix Ex TaqTM II (Perfect Real Time)(TaKaRa, 日本)试剂, PCR 体系(20 μ l)为: SYBR Premix Ex TaqTM II 10 μ l, 正反向引物各 0.8 μ l, cDNA 模板 1 μ l, ddH₂O 7.4 μ l。垂体 GH 扩增条件: 95℃ 30 s, (95℃ 5 s, 60℃ 20 s) 40 个循环。肝脏、卵巢和脑 IGF- I 扩增条件: 95℃ 30 s, (95℃

表 1 半滑舌鲷 *GH*、*IGF- I* 和 18S rRNA 的 qRT-PCR 引物

Tab.1 Primers used for quantitative real-time PCR analysis of *GH*, *IGF- I* and 18S rRNA of *C. semilaevis*

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	目的片段 Target sequence	片段长度 Sequence length (bp)
GH-RT-F	ATCTCCAAACGACT GGTTGACTCC	<i>GH</i>	209
GH-RT-R	TTGCCGCCAGGTT CTCATAG		
IGF1-RT-F	GTGGCATTCTGGG ATGTC	<i>IGF- I</i>	80
IGF1-RT-R	GGACGCACAGCAG TAGTGAG		
18s-F	CCTGAGAAACGGCT ACCACATC	18S rRNA	119
18s-R	CCAATTACAGGGCC TCGAAAG		

5 s, 60°C 25 s)40 个循环。以 18S rRNA 作为内参基因, *GH*、*IGF- I* 和 18S rRNA 的基因扩增效率均达到 0.99 以上, 表明扩增的特异性强。

每个 qRT-PCR 反应均设置阴性对照, 每个样品设置 3 个平行, 重复 3 次以确认结果数据的可靠性。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算处理定量扩增数据(Livak *et al*, 2001)。

1.4 血清激素的测定

取每个发育时期 3 尾亲鱼血清样品用于激素测定。血清中 E2 和 T 的测定采用放射免疫法(RIA)进行, 使用 ^{125}I 标记的哺乳动物 E2 和 T 放射免疫测定试剂盒(天津九鼎医学生物工程有限公司), T 的检测灵敏度为 1.9 ng/dl, E2 的检测灵敏度为 2.1 pg/ml, 具体的测定操作和数据处理方法同 Xu 等(2012)。

采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清中 GH 和 IGF- I 表达水平, 利用鱼类 GH ELISA Kit 和 IGF- I ELISA Kit (CUSABIO)进行测定。选取每个不同卵巢发育时期的血清样品 3 个, 设置 3 个平行。操作步骤和数据处理参照试剂盒说明书进行, 首先制作标准曲线($r>0.99$), 根据标准曲线计算血清样品中激素的表达水平。

1.5 数据处理

GSI、激素表达与基因表达数据表示为平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD), 对 GSI、血清激素、*GH* mRNA、*IGF- I* mRNA 表达水平分别进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 统计不同发育时期各指标的差异显著性。利用相关性分析法分析指标之间的相关性, 使用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 当 $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 卵巢发育分期

通过组织切片将本研究所用的半滑舌鲷亲鱼卵巢发育过程划分为 II、III、IV、V、VI 5 个时期, 每个时期的亲鱼数量为 3-4 尾。计算 GSI 值得知, II 期和 III 期卵巢的 GSI 值较低(<5), IV 期卵巢 GSI 值显著升高(14.2-15.5, $P<0.05$), 至 V 期卵巢时达峰值(25.6-30.8, $P<0.05$), VI 期卵巢 GSI 值与 IV 期无显著差异($P>0.05$) (图 1)。

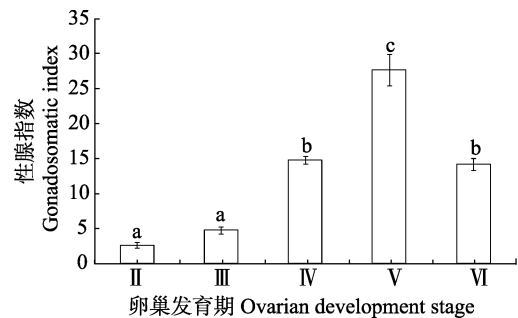


图 1 卵巢不同发育时期的性腺指数
Fig.1 The gonadosomatic index of ovary at different development stages

不同字母表示差异显著($P<0.05$), 下同
Different letters indicated significant difference ($P<0.05$), the same as below

2.2 垂体 *GH* mRNA 在卵巢不同发育时期的表达特性

在卵巢的不同发育时期, 垂体 *GH* mRNA 表达水平差异显著。II 期和 III 期卵巢时, 垂体 *GH* mRNA 表达水平较低($P<0.01$), IV 期卵巢时 *GH* mRNA 表达水平显著升高, 至 V 期卵巢时表达水平达峰值($P<0.01$), 但 VI 期卵巢时垂体, *GH* mRNA 表达水平迅速下降至 II 期和 III 期卵巢水平($P<0.01$)(图 2)。

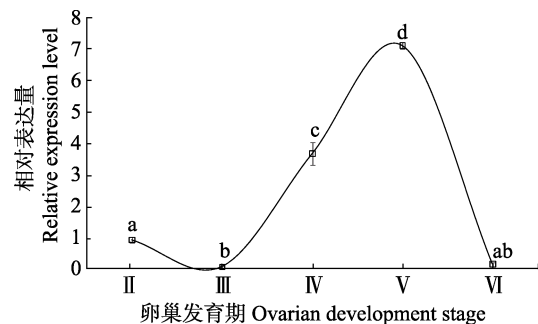


图 2 卵巢不同发育时期垂体中 *GH* mRNA 的表达水平变化
Fig.2 Pituitary *GH* mRNA levels at different ovarian developmental stages

2.3 肝脏、卵巢和脑中 IGF- I mRNA 在卵巢不同发育时期的表达特性

在卵巢不同发育时期, 肝脏、卵巢和脑中 IGF- I mRNA 表达水平变化见图3。肝脏中 IGF- I mRNA 表达水平相对较高, 是脑和性腺中 IGF- I mRNA 表达水平的 10 倍以上。肝脏 IGF- I mRNA 表达水平自 II 期卵巢开始下降($P<0.01$), 在 IV 期和 V 期卵巢时下降至最低水平($P<0.01$), 但 VI 期卵巢时又显著升高($P<0.01$)。卵巢中 IGF- I mRNA 表达水平自 II 期开始显著升高($P<0.05$), 并在 IV 期时达峰值($P<0.05$),

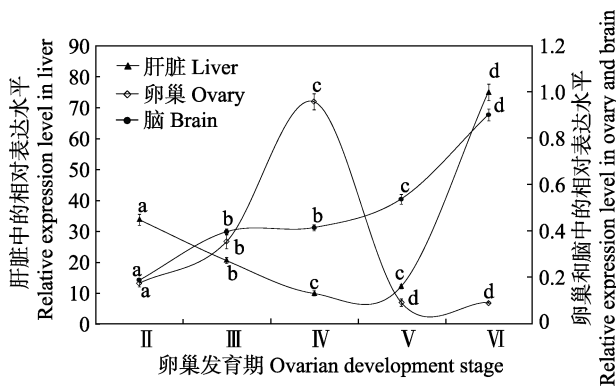


图3 肝脏、卵巢和脑中 IGF- I mRNA 在卵巢不同发育时期的表达水平变化

Fig.3 IGF- I mRNA levels in liver, ovary and brain at different ovarian developmental stages

但在 V 期时明显下降($P<0.05$), 并保持至 VI 期。脑中 IGF- I mRNA 表达水平自 II 期卵巢开始显著升高, 至 IV 期卵巢时达峰值($P<0.05$)。

2.4 血清中激素浓度变化

血清 GH 表达水平与垂体 GH mRNA 表达水平表现出相同的变化趋势, 在 II 期和 III 期卵巢时保持较低水平, 最低值[(724.54±75.79) pg/ml]出现在卵巢发育至 III 期时。IV 期卵巢时, 血清 GH 水平显著升高并在 V 期卵巢时达到峰值[(2485.59±130.63) pg/ml] ($P<0.05$), 其后在 VI 期卵巢时显著降低($P<0.05$)(图 4-A)。

血清中 IGF- I 表达水平在 II 期和 III 期卵巢时差异不显著($P>0.05$), 而在 IV 期卵巢时显著降低[(165.53±26.71) pg/ml], 其后在 V 期时显著升高($P<0.05$), 并在 VI 期卵巢达到峰值 [(630.18±31.49) pg/ml] ($P<0.05$) (图 4-B)。血清中 IGF- I 浓度与肝脏 IGF- I mRNA 表达水平表现出类似的变化规律。

血清中 E2 表达水平从 II 期卵巢开始显著升高, 并在 IV 期卵巢达峰值[(313.41±15.48) pg/ml] ($P<0.05$), 其后又在 V 期卵巢显著降低($P<0.05$), 并在 VI 期卵巢继续降低[(93.38±3.56) pg/ml] ($P<0.05$)(图 4-C)。血清 T 表达水平随卵巢发育逐渐升高, 并在 V 期卵巢时达峰值 [(45.26±3.14) ng/dl] ($P<0.05$), 但在 VI 期卵巢时显著下降至 II 期卵巢水平[(5.56±0.39) ng/dl] ($P<0.05$) (图 4-D)。

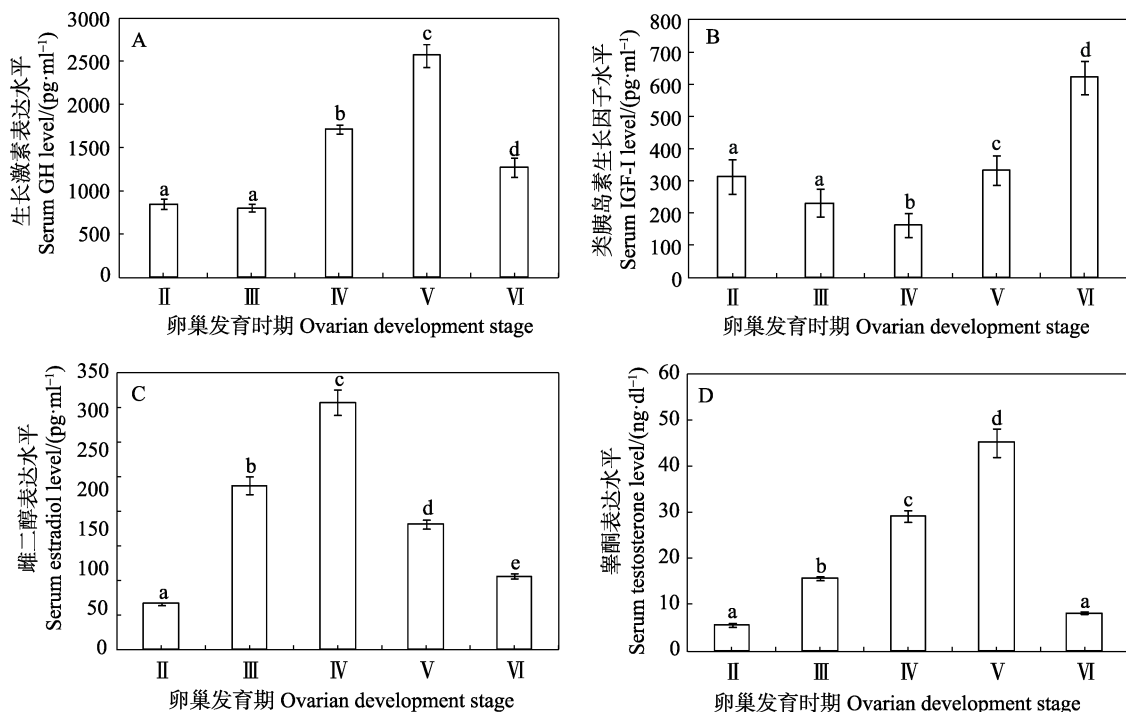


图4 卵巢不同发育时期血清中 GH、IGF- I、E2 和 T 表达水平

Fig.4 The serum GH, IGF- I, E2 and T expression levels at different ovarian developmental stages

2.5 卵巢发育过程中生殖与生长因子的相关性分析

卵巢发育过程中生殖与生长因子的相关性分析表明(表 2), 半滑舌鲷卵巢发育过程中, 垂体 *GH* mRNA 表达水平(PGH)与 GSI ($P<0.01$)、血清 GH 表达水平(SGH)($P<0.01$)、血清 IGF- I 表达水平(SIGF) ($P<0.05$)存在显著的正相关关系。肝脏 *IGF- I* mRNA 表达水平(LIGF)与脑 *IGF- I* mRNA 表达水平(BIGF)、SIGF 呈显著正相关关系($P<0.01$), 而与血清雌二醇表达水平(SE)($P<0.05$)、ST($P<0.01$)呈显著负相关关系。卵巢 *IGF- I* mRNA 表达水平(OIGF)与 SE 呈显著正相关关系($P<0.01$), 而与 SIGF 呈显著的负相关关系($P<0.01$)。BIGF 与 SIGF 呈显著的负相关关系($P<0.01$)。ST 与 SGH 呈显著正相关关系($P<0.01$)。

3 讨论

本研究揭示了生长因子 *GH* 和 *IGF- I* 的 mRNA 与多肽在半滑舌鲷不同卵巢发育阶段的差异表达特性及其与 GSI 和性类固醇激素表达变化的互作关系, 证明了 GH/IGF- I 轴对卵巢发育起着重要的调控作用, 为深入认识半滑舌鲷卵巢发育的调控机制提供了新的思路。

硬骨鱼类必须保持一定的生长潜力和速度才能为自身的生殖活动提供充足的能量储备(Berishvili *et al.*, 2010)。鱼类的生长主要由 GH/IGF- I 轴调控, 垂体释放 GH 至血液循环系统, 达到肝脏后通过与其受体结合作用刺激 IGF- I 分泌和表达, 从而进一步促进细胞分裂、增殖和生长(Reinecke *et al.*, 2005)。GH 是迄今研究最为深入的生长因子, 除与其他生长因子互

作共同调控动物生长与生产性状外, GH 还受到 GnRH、E2、FSH、LH 等生殖因子的调控(Riley *et al.*, 2002; Cannata *et al.*, 2010; 周立斌等, 2004), 表明 GH 在动物的生殖过程同样起着重要的调控作用。王德寿等(1999)对大鳍鱠(*Mystus macropterus*) GH 的研究表明, 血清 GH 含量的变化与生殖周期密切相关, 并在产卵期急剧升高, 至性腺退化期达最高, 可能是对生殖消耗能量代谢的一种有效补充调控。周立斌等(2004)对长尾鲩(*Leiocassis tenuis*)的研究也表明, 血清 GH 含量在卵巢成熟期达到最大值, 与生殖过程密切相关。垂体 *GH* mRNA 与血清 GH 都在大西洋鲑鱼(*Salmo salar* L.)性腺的发育和成熟过程中起到了积极的促进作用(Benedet *et al.*, 2010)。本研究发现, 半滑舌鲷血清 GH 表达水平随着卵巢发育而升高, 并在 V 期卵巢达峰值, 而在卵巢退化期显著下降。作者还发现, GH 与 GSI 的变化具有显著正相关关系, 而 GSI 值的变化可直接反映出亲鱼性腺的发育和生长状态, 这表明半滑舌鲷血清 GH 对卵巢发育成熟具有明显的促进作用。半滑舌鲷垂体 *GH* mRNA 表达水平表现出与血清 GH 表达水平一致的变化趋势, 并与血清 GH 和 IGF- I 表达水平呈显著正相关关系, 符合 GH/IGF- I 轴生理作用的经典通路, 与鲑鱼类研究结果一致(Campbell *et al.*, 2006), 进一步验证了 GH 在转录水平、血清水平与 IGF- I 共同参与了半滑舌鲷卵巢发育的调控。性类固醇激素(E2、T 等)是鱼类性腺成熟的关键调控因子, 参与配子的发育、最终成熟和配子排放过程(Zohar *et al.*, 2001)。本研究发现血清 GH 与血清 T 表达水平呈显著正相关关系, 表明 GH 可能

表 2 半滑舌鲷卵巢不同发育时期生长与生殖因子表达的关系

Tab.2 The correlation between growth factors and reproductive factors at different ovarian development stages

指标 Indices	GSI	PGH	LIGF	OIGF	BIGF	SE	ST	SGH	SIGF
GSI	1.000	0.849**	-0.189	-0.084	0.464	0.210	0.852**	0.953**	0.160
PGH		1.000	0.329	-0.269	0.782	-0.095	0.459	0.736**	0.589*
LIGF			1.000	-0.509	0.670**	-0.640*	-0.667**	-0.375	0.904**
OIGF				1.000	-0.2911	0.879**	0.193	0.021	-0.671**
BIGF					1.000	-0.120	0.23	0.262	0.767**
SE						1.000	0.506	0.280	-0.673**
ST							1.000	0.904**	-0.345
SGH								1.000	-0.048
SIGF									1.000

*表示差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$)。PGH: 垂体 *GH* mRNA 表达水平; LIGF: 肝脏 *IGF- I* mRNA 表达水平; OIGF: 卵巢 *IGF- I* mRNA 表达水平; BIGF: 脑 *IGF- I* mRNA 表达水平; SE: 血清 E2 表达水平; ST: 血清 T 表达水平; SGH: 血清 GH 表达水平; SIGF: 血清 IGF- I 表达水平

* indicated significant difference ($P<0.05$), ** indicated highly significant difference ($P<0.01$). PGH: Pituitary *GH* mRNA level; LIGF: Liver *IGF- I* mRNA level; OIGF: Ovarian *IGF- I* mRNA level; BIGF: Brain *IGF- I* mRNA level; SE: Serum E2 level; ST: Serum T level; SGH: Serum GH level; SIGF: Serum IGF- I level

也与性类固醇激素共同参与配子的生长发育调控,但具体的调控信号途径有待于对其受体及血清激素清除规律的深入研究。

半滑舌鳎 IGF- I 具有广泛的组织表达特性,在包括肝脏、脑、卵巢等多个组织中均有较高水平的表达(季相山, 2009)¹⁾。GH 与 IGF- I 在半滑舌鳎早期生长发育过程中起着同样重要的调控作用(Ma *et al.*, 2011、2012)。IGF- I 可在体外促进鱼类卵巢滤泡细胞性类固醇激素分泌,并可通过直接或者间接的作用调控鱼类配子的发育和成熟(Kagawa *et al.*, 2003)。在大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*)中,卵巢成熟产卵前血清 IGF- I 与血清 E2、T 都有正相关关系,表明其与性类固醇激素一起参与产卵调控过程(Onuma *et al.*, 2009)。在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)卵子的卵黄发生期,IGF- I 可通过调控芳香化酶基因 *cyp19a1a* 上调表达来促进卵子发育(Nakamura *et al.*, 2016)。本研究发现在转录水平上,肝脏 IGF- I mRNA 表达水平在卵巢发育过程中下调表达,但在产卵结束后的Ⅵ期卵巢显著上调表达,这与血清 IGF- I 表达水平变化趋势一致,Ⅳ期卵巢是卵子卵黄发生的关键时期,此时期 E2 因为参与到配子卵黄发生调控过程而大量分泌和合成(Zohar *et al.*, 2010),而肝脏 IGF- I mRNA 表达水平与 SIGF 呈显著正相关关系,而与血清雌二醇表达水平(SE)呈显著负相关关系,表明肝脏与血清 IGF- I 与性类固醇激素共同参与了配子的卵黄发生和累积过程。脑中 IGF- I mRNA 一直处于上调表达状态,直至Ⅵ期卵巢才达峰值,并与血清 IGF- I 呈显著的负相关关系,表明脑 IGF- I 与垂体 GH mRNA 和血清 IGF- I 表达水平在调控卵巢发育过程中可能存在某种应答或协同作用,有待于深入研究确证。卵巢 IGF- I mRNA 在Ⅳ期卵巢前一直处于显著上升表达,而在产卵期后(Ⅴ期)显著下调表达,与血清 E2 表达水平呈显著正相关关系,而与血清 IGF- I 表达水平呈显著的负相关关系,表明卵巢 IGF- I 直接参与配子发生和发育过程调控,与 Campbell 等(2006)对鲑鱼的研究结果一致,具体的调控机制与雌二醇表达特性有关,尚需进一步研究。血清 IGF- I 表达水平在产卵前一直较低,而在产卵期(Ⅴ期)和产卵后期(Ⅵ期)均处于较高表达水平,这种变化趋势与产卵期配子生长、卵黄累积及产卵后的卵巢恢复生长密切相关

关(Guzmán *et al.*, 2008)。

综上所述,本研究发现 GH、IGF- I 从转录和血清学水平都以协同或者拮抗的方式共同参与了半滑舌鳎卵巢发育的过程,且其作用途径与性类固醇激素的合成与分泌有关,表明 GH/IGF- I 轴对卵巢发育具有重要的调控作用,但其具体的机制有待于对其信号途径的深入研究。

参 考 文 献

- Benedet S, Andersson E, Mittelholzer C, *et al.* Pituitary and plasma growth hormone dynamics during sexual maturation of female Atlantic salmon. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 167(1): 77–85
- Berishvili G, Baroiller J, Eppler E, *et al.* Insulin-like growth factor-3 (IGF-3) in male and female gonads of the tilapia: Development and regulation of gene expression by growth hormone (GH) and 17 α -ethinylestradiol (EE2). *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 167(1): 128–134
- Campbell B, Dickey J, Beckman B, *et al.* Previtellogenic oocyte growth in salmon: Relationships among body growth, plasma insulin-like growth factor-1, estradiol-17 beta, follicle-stimulating hormone and expression of ovarian genes for insulin-like growth factors, steroidogenic-acute regulatory protein and receptors for gonadotropins, growth hormone, and somatolactin. *Biology of Reproduction*, 2006, 75(1): 34–44
- Cannata D, Vijayakumar A, Fierz Y, *et al.* The GH/IGF-1 axis in growth and development: New insights derived from animal models. *Advances in Pediatrics*, 2010, 57(1): 331–351
- Chen XY, Wen HS, He F, *et al.* Expression analysis of FSHR and LHR mRNAs during the reproductive cycle of males *Cynoglossus semilaevis*. *Oceanologica et Limnologia Sinica*, 2011, 42(2): 201–206 [陈晓燕, 温海深, 何峰, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)促性腺激素受体在雄性生殖周期中的表达. *海洋与湖沼*, 2011, 42(2): 201–206]
- Guzmán J, Norberg B, Ramos J, *et al.* Vitellogenin, steroid plasma levels and spawning performance of cultured female Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 156(2): 285–297
- Kagawa H, Gen K, Okuzawa K, *et al.* Effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on aromatase activity and P450 aromatase gene expression in the ovarian follicles of red seabream, *Pagrus major*. *Biology of Reproduction*, 2003, 68(5): 1562–1568

1) JI XS. Study on the genes of male and female half smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* Günther differentially expressed in the procedure of gynogenesis induction, genetic analysis and growth. Doctoral Dissertation of Shandong Agricultural University, 2009, 68–129 [季相山. 半滑舌鳎雌核发育诱导、遗传分析及生长相关基因雌雄差异表达研究. 山东农业大学博士研究生学位论文, 2009, 68–129]

- Kajimura S, Kawaguchi N, Kaneko T, *et al.* Identification of the growth hormone receptor in an advanced teleost, the tilapia (*Oreochromis mossambicus*) with special reference to its distinct expression pattern in the ovary. *Journal of Endocrinology*, 2004, 181(1): 65–76
- Lei JL. *Marine fish culture theory and technology*. Beijing: China Agricultural Press, 2005 [雷霖. 海水鱼类养殖理论与技术. 北京: 中国农业出版社, 2005]
- Li XX, Liu XZ, Shi B, *et al.* Cloning and mRNA expression pattern of common glycoprotein α subunit of GtH in tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(5): 23–30 [李晓晓, 柳学周, 史宝, 等. 半滑舌鲷促性腺激素 α 亚基 cDNA 的克隆及组织表达特征. *渔业科学进展*, 2013, 34(5): 23–30]
- Lin HR. *Fish Physiology*. Guangzhou: Sun Yat-sen University Press, 2011, 153–264 [林浩然. 鱼类生理学. 广州: 中山大学出版社, 2011, 153–264]
- Lin HR. The interactions of neuroendocrine regulation on reproduction and growth in fish. *Zoological Research*, 2000, 21(1): 12–16 [林浩然. 神经内分泌因子调控鱼类生殖和生长的相互作用. *动物学研究*, 2000, 21(1): 12–16]
- Liu XZ, Shi B, Li XX, *et al.* Molecular characterization of the novel membrane progesterin receptor gene and its role during ovarian development in the half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(4): 608–619 [柳学周, 史宝, 李晓晓, 等. 半滑舌鲷新型膜孕激素受体基因分子特征及其在卵巢发育过程的作用. *中国水产科学*, 2015, 22(4): 608–619]
- Liu XZ, Xu YJ, Liu NZ, *et al.* Study on histological and morphometrical characters of gonadal development of *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(6): 25–35 [柳学周, 徐永江, 刘乃真, 等. 半滑舌鲷卵巢发育的组织学和形态数量特征研究. *渔业科学进展*, 2009, 30(6): 25–35]
- Liu XZ, Zhuang ZM. *Reproductive biology and culture technology of half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis**. Beijing: China Agricultural Press, 2014, 259–394 [柳学周, 庄志猛. 半滑舌鲷繁育理论与养殖技术. 北京: 中国农业出版社, 2014, 259–394]
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- Ma Q, Liu SF, Zhuang ZM, *et al.* Genomic structure, polymorphism and expression analysis of the growth hormone (GH) gene in female and male Half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Gene*, 2012, 493(1): 92–104
- Ma Q, Liu SF, Zhuang ZM, *et al.* Molecular cloning, expression analysis of insulin-like growth factor I (IGF- I) gene and IGF- I serum concentration in female and male Tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 160(4): 208–214
- Nakamura I, Kusakabe M, Swanson P, *et al.* Regulation of sex steroid production and mRNAs encoding gonadotropin receptors and steroidogenic proteins by gonadotropins, cyclic AMP and insulin-like growth factor-I in ovarian follicles of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at two stages of vitellogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular and Integrative Physiology*, 2016, 201: 132–140
- Onuma TA, Makino K, Ban M, *et al.* Elevation of the plasma level of insulin-like growth factor-I with reproductive maturation prior to initiation of spawning migration of chum salmon. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2009, 1163(3): 497–500
- Reinecke M, Björnsson BT, Dickhoff WW, *et al.* Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: Where we are and where to go. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 142(1–2): 20–24
- Reinecke M. Insulin-like growth factors and fish reproduction. *Biology of Reproduction*, 2010, 82(4): 656–661
- Riley LG, Richman NH III, Hirano T, *et al.* Activation of the growth hormone/insulin-like growth factor axis by treatment with 17α -methyltestosterone and seawater rearing in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *General and Comparative Endocrinology*, 2002, 127(3): 285–292
- Shi B, Li XX, Liu XZ, *et al.* Molecular cloning and tissue expression analysis of membrane progesterin receptor alpha gene (mPR α) from half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(3): 61–67 [史宝, 李晓晓, 柳学周, 等. 半滑舌鲷膜孕激素受体基因克隆与组织表达分析. *渔业科学进展*, 2013, 34(3): 61–67]
- Shi B, Liu XZ, Xu YJ, *et al.* Molecular characterization of three gonadotropin subunits and their expression patterns during ovarian maturation in *Cynoglossus semilaevis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(2): 2767–2793
- Wang DS, Lin HR, Zhang WM. Seasonal changes of the pituitary and serum basal growth hormone levels of *Mystus macropterus*. *Journal of Fisheries of China*, 1999, 23(1): 1–5 [王德寿, 林浩然, 张卫民. 大鳍鱮脑垂体和血清生长激素水平的季节变化. *水产学报*, 1999, 23(1): 1–5]
- Xu YJ, Liu XZ, Liao MJ, *et al.* Molecular cloning and differential expression of three GnRH genes during ovarian maturation of spotted halibut, *Verasper variegatus*. *Journal of Experimental Zoology Part A Ecological Genetics and Physiology*, 2012, 317(7): 434–446
- Xu YJ, Liu XZ, Wang QY, *et al.* Relationships between serum sex steroids levels and gonadal development and photothermal regulation during the annual maturation of captive *Cynoglossus Semilaevis* Günther. *Oceanologica et Limnologia Sinica*, 2011, 42(1): 67–74 [徐永江, 柳学周, 王清印, 等. 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)血浆性类固醇激素表达与卵巢发育及温光调控的关系研究. *海洋与湖沼*, 2011, 42(1): 67–74]
- Zhou LB, Liu XC, Ye W, *et al.* Sexual cycle changes of growth hormone in Helmet catfish, *Cranoglanis boudierius*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28(6): 679–681 [周立斌, 刘晓春, 叶卫, 等. 长臀鲩生长激素的生殖周期变化. *水生生物学报*, 2004, 28(6): 679–681]
- Zhou XS, Yi Q, Zhang QQ, *et al.* Molecular cloning, tissue distribution, and ontogeny of gonadotropin-releasing

hormone III gene (GnRH-III) in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 163(1): 59–64

Zohar Y, Muñoz-Cueto JA, Elizur A, *et al.* *Neuroendocrinology*

of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(3): 438–455

Zohar Y, Mylonas CC. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: From hormones to genes. *Aquaculture*, 2001, 197: 99–136

(编辑 马瑾艳)

Physiological Role of GH/IGF- I Axis in Ovarian Development of *Cynoglossus semilaevis*

XU Yongjiang^{1,2}, LIU Xuezhou^{1,2①}, SHI Ying³, WANG Bin^{1,2},
SHI Bao^{1,2}, ZHANG Kai⁴, LAN Gonggang⁴

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. Qingdao Extension Station of Fisheries Technology, Qingdao 266071; 4. Qingdao Beibao Marine Science and Technology Co. Ltd., Qingdao 266400)

Abstract In order to deeply understand underlying mechanisms for regulating reproductive trait of *Cynoglossus semilaevis*, the physiological role of GH/IGF- I axis in ovarian development was explored. The levels of growth hormone (GH) mRNA of pituitary and IGF- I mRNA of liver, brain, and ovary at different ovarian development stages were determined by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis. Meanwhile, the expression levels of serum GH, IGF- I, estradiol (E2) and testosterone (T) were detected by radioimmunoassay (RIA) and ELISA methods, respectively. Furthermore, the correlation between the mRNA and peptides expression levels of GH, IGF- I and gonadosomatic index (GSI), and the one between the expression levels of serum E2 and serum T during ovarian development was calculated with statistical methods. The results showed that, the levels of pituitary GH mRNA significantly increased at stage IV ovary, and peaked at stage V ovary, but decreased significantly post spawning (stage VI). It has significantly positive relationship with the expression levels of GSI, serum GH and serum IGF- I during ovarian development. The serum GH levels showed similar trend with pituitary GH mRNA expression levels. Liver IGF- I mRNA achieved the minimum levels at stage IV and stage V ovaries, but with a significant increase at stage VI ovary. It was significantly positive correlated with brain IGF- I mRNA levels and serum IGF- I levels, but significantly negative correlated with serum E2 and serum T levels during ovarian development. Brain IGF- I mRNA levels significantly increased since stage II ovary and peaked at stage IV ovary, and showed a significant negative relationship with serum IGF- I levels. Ovary IGF- I mRNA levels significantly increased at stage II ovary and peaked at stage IV ovary, then significantly declined at stage V ovary until stage VI ovary. It was significantly correlated with serum E2 levels but negatively correlated with serum IGF- I levels. Serum IGF- I levels showed similar trend with liver IGF- I mRNA levels, which significantly decreased at stage IV ovary, but then significantly ascended to peak at stage VI ovary. These results revealed that GH and IGF- I synergistically or antagonistically play physiological role in ovarian development of *C. semilaevis* in endocrine or paracrine ways, and their regulation functions are related with synthesis/secretion during ovary development regulation. The present results could provide a new clue for better understanding the possible mechanism for reproductive regulation of *C. semilaevis*.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; Growth hormone; Insulin-like growth factor ; Ovarian development; Regulation mechanism

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)黑色素富集激素基因的克隆和表达



徐永江^{1,2} 朱学武^{1,3} 柳学周^{1,2①} 史学营^{1,3}

史宝^{1,2} 王滨^{1,2} 李斌^{1,3}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 为研究黑色素富集激素基因(*MCH*)表达调控与半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)无眼侧黑化性状的关系,通过分子克隆获得了半滑舌鳎*pMCH2*,通过NCBI获得了*pMCH1* cDNA序列,分析了*pMCH* mRNA的组织表达特性,探索了脑垂体和皮肤中的*pMCH* mRNA表达与无眼侧黑化程度的关系。结果显示,*pMCH1* cDNA序列长476 bp,编码134个氨基酸,与鲈形目、鲤形目和鲈形目鱼类的*pMCH1*氨基酸聚为1个进化分支。*pMCH2* cDNA序列全长为626 bp,编码147个氨基酸,与鲈形目和鲈形目鱼类的*pMCH2*氨基酸聚为1个进化分支。2种*MCH* mRNA在垂体中表达量最高,同时,*MCH1* mRNA在除肌肉外的其他组织中均可检测到表达;*MCH2* mRNA在脑、有眼侧皮肤、无眼侧正常皮肤、性腺和鳃组织中也可检测到较高表达。*MCH* mRNA表达与无眼侧黑化程度的关系分析显示,脑垂体和皮肤中*MCH1* mRNA表现出相似的表达变化趋势,都是10%黑化组的表达量最高,而后随黑化程度加大显著降低。对于*MCH2*而言,无眼侧正常鱼和无眼侧50%黑化鱼的脑垂体中都具有较高的*MCH2* mRNA表达水平,但在无眼侧10%黑化组和无眼侧80%黑化组,其表达水平显著降低。皮肤中*MCH2*表现出随黑化程度加大而显著升高的趋势。本研究结果可为认识*MCH*基因与半滑舌鳎无眼侧黑化性状的表达调控关系提供基础资料。

关键词 半滑舌鳎; 黑色素富集激素; 无眼侧黑化; 表达调控

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2017)01-0081-10

在鱼类中,黑色素富集激素(Melanin concentration hormone, MCH)基因最初是从大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*)中分离鉴定出来的(Kawauchi *et al.*, 1983)。在体色调控方面, MCH的主要功能是弱化或抑制鲈形类无眼侧黑化发生。Takeshi等(2007)对牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)的研究发现,白色养殖环境下无眼侧黑化比例显著低于黑色养殖环境,而且白色养殖环境下脑

MCH mRNA表达水平显著高于黑色养殖环境,表明*MCH*在抑制牙鲈无眼侧黑化方面具有重要调控作用。外源MCH处理可令条斑星鲈(*Verasper moseri*)有眼侧皮肤黑化程度大为弱化,同时脑中的*MCH* mRNA的表达水平升高(Takahashi *et al.*, 2004)。20世纪80年代以来,从大马哈鱼(Minsh *et al.*, 1989)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)(Gröneveld *et al.*, 1993)、虹鳟

* 国家鲈形类产业技术体系项目(CARS-50)和国家国际科技合作专项(2013DFA31410)共同资助 [This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-50) and International Science and Technology Cooperation Program of China (2013DFA31410)]. 徐永江, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-03-02, 收修改稿日期: 2016-05-06

(*Oncorhynchus mykiss*)(Baker *et al.*, 1995)、金鱼(*Carassius auratus*)(Mizusawa *et al.*, 2009)、斑马鱼(*Danio rerio*)(Berman *et al.*, 2009)、美洲拟鲮(*Pseudopleuronectes americanus*)(Tuziak *et al.*, 2012)和星斑川鲮(*Platichthys stellatus*)(Kang *et al.*, 2013)等多种鱼类的脑中相继得到了 MCH 类神经肽,特别是由斑马鱼、美洲拟鲮和星斑川鲮等中均鉴定出 MCH 的 2 种亚型基因(*MCH1* 和 *MCH2*)。Kang 等(2013)研究发现,在星斑川鲮对白色与暗色背景适应过程中,其无眼侧体色和丘脑中的 *MCH1*、*MCH2* mRNA 水平都发生了明显的差异表达变化,另有研究证实, *MCH1* 对无眼侧黑化有抑制作用(Amiya *et al.*, 2005), *MCH2* 表达量的增加导致鱼类皮肤颜色变白(Mizusawa *et al.*, 2015),表明 *MCH1* 和 *MCH2* 均参与了鲆鲽类无眼侧体色的变化调控。

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)为暖温性近海大型底层鱼类,我国近岸海域均有分布,以渤海、黄海为多,是一种理想的增殖放流和人工养殖种类,现已成为我国鲆鲽类三大主导养殖种类之一(邓景耀等, 1988; 柳学周等, 2006)。随着养殖业的发展,养殖半滑舌鲷无眼侧体色黑化的问题日益凸显,这种无眼侧黑化现象严重影响了其市场价格(比正常鱼低 20%–30%),成为阻碍半滑舌鲷养殖产业持续发展的瓶颈之一。为深入认识半滑舌鲷无眼侧黑化发生及其抑制调控机制,作者研究了 *MCH* 基因的结构及组织表达特性,分析了其表达调控与无眼侧黑化程度的关系,以期探究 *MCH* 调控半滑舌鲷无眼侧黑化的作用机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用半滑舌鲷取自山东省日照市海洋资源增殖站。取样实验鱼 3 尾,全长为 25–35 cm,体重为

250–450 g,用 MS-222 (260 mg/L)麻醉致死,快速置于冰上,取性腺、肝脏、心脏、胃、肠、脾、肾、头肾、垂体、脑、鳃、肌肉、有眼侧皮肤、无眼侧黑化皮肤(黑皮)、无眼侧正常皮肤(白皮),共 15 个组织,投入液氮中速冻,后转入–80℃超低温冰箱保存,提取总 RNA,进行基因克隆和组织表达分析。

取同一产卵批次的全长为 10–15 cm 的半滑舌鲷 12 尾,按照其无眼侧黑化面积的不同划分为 4 组(0、10%、50%、80%),每组 3 尾,取其脑垂体(脑与垂体合并)和皮肤组织,用于分析 *MCH* mRNA 表达与无眼侧黑化程度的关系。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 第 1 链的合成

利用 RNAiso Plus(TaKaRa, 日本)分别提取 1.1 中 15 个组织的总 RNA,以 1%琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop2000 (Thermo, 美国)检测 RNA 的质量和浓度。

取 1 μg 脑组织 RNA,以 PrimeScript RT reagent Kit 反转录试剂盒(TaKaRa, 日本)合成 cDNA 第 1 链,于–20℃保存,用于中间片段克隆。以 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, 美国)合成 5'-RACE 及 3'-RACE cDNA 第 1 链,用于 RACE 实验。取各组织的总 RNA,用反转录合成 cDNA 第 1 链,用于 *MCH* mRNA 的定量表达分析。各操作步骤均严格按照试剂盒说明书进行。

1.3 *MCH2* 基因 cDNA 克隆

pMCH2 核心片段序列从 NCBI 下载(GenBank 序列号: XM_008315412.1),设计 *MCH2* 的 RACE 引物 MCH2-GSP5、MCH2-GSP3、MCH2-NGSP5、MCH2-NGSP3(表 1),应用 SMART™ RACE cDNA 扩增试剂盒(TaKaRa, 日本)扩增 *pMCH2* 的 cDNA 全长序列。以脑第 1 链 cDNA 为模板,用 Smart RACE Advantage 2 PCR 试剂盒(Clontech, 美国)进行 PCR 扩增。第 1 次梯度 PCR 使用引物 MCH2-5'OUTER 和 MCH2-3'OUTER,

表 1 半滑舌鲷 *MCH2* cDNA 序列克隆引物
Tab.1 Primers used for cloning *MCH2* of *C. semilaevis*

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'–3')	作用 Purpose
UPM-long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	5'和 3'-RACE PCR
UPM-short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	5'和 3'-RACE PCR
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	5'和 3'-RACE 巢式 PCR
MCH2-5'OUTER	TTCCCCAGCAGGGTCGGTAAACTCT	MCH2 5'-RACE PCR
MCH2-5'INNER	GGTTTCCGTCGTCTGCTCTGTAGTTGTT	MCH2 5'-RACE 巢式 PCR
MCH2-3'OUTER	ATCGTCTGGTGACCTCTGACCCCTG	MCH2 3'-RACE PCR
MCH2-3'INNER	CCGCCACAGGAGTCGTGATGTTTTC	MCH2 3'-RACE 巢式 PCR

反应体系(25 μ l): 17.25 μ l ddH₂O、2.5 μ l Buffer、0.5 μ l 50 \times dNTP Mix、0.5 μ l 50 \times Advantage 2 Polymerase Mix、1.25 μ l cDNA、2.5 μ l UPM 引物和 0.5 μ l OUTER 引物; PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 30 s、67 $^{\circ}$ C 30 s(每个循环递减 0.5 $^{\circ}$ C)、72 $^{\circ}$ C 1 min, 15 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s、58 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 28 个循环。

以 *pMCH2* 第 1 次 PCR 产物为模板, 使用引物 MCH2-5'INNER 和 MCH2-3'INNER 分别进行巢式 PCR, 反应体系(25 μ l)为: 1.25 μ l 第 1 次 PCR 产物稀释液、19.25 μ l ddH₂O、2.5 μ l Buffer、0.5 μ l 50 \times dNTP Mix、0.5 μ l 50 \times Advantage 2 Polymerase Mix、0.5 μ l NUP 引物、0.5 μ l INNER 引物, PCR 扩增条件同第 1 次 PCR。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后, 切胶回收、连接、转化, 接种至 LB 固体培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。以通用引物 M13F 和 M13R 进行菌落 PCR 扩增, 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, (94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s) 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。挑选阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.4 *MCH* mRNA 的定量表达分析

根据从 NCBI 下载的 *pMCH1*(GenBank 序列号: XP_008322511.1)的 cDNA 序列和本研究获得的半滑舌鲷 *pMCH2* 的 cDNA 序列全长, 分别设计 2 对定量

引物 MCH1-DF 和 MCH1-DR、MCH2-DF 和 MCH2-DR, 以 β -actin 为内参设计定量引物 β -actin-F 和 β -actin-R, 定量 PCR 所用各引物序列见表 2。

\beta-actin、*pMCH1* 和 *pMCH2* 定量 PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 58 $^{\circ}$ C 20 s, 共 40 个循环。标准曲线制作以脑 cDNA 为模板(同 1.3)进行 5 倍梯度稀释成 6 个标准品进行。每一组织样品的分析设置 3 个重复, 每次实验均设置空白对照, PCR 特异性扩增效率为 95%–106%。

1.5 结果分析

pMCH 基因的序列拼接、氨基酸序列推导、分子量预测、等电点预测及氨基酸同源性分析均使用 DNASTAR 5.0.1, 信号肽预测使用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。氨基酸序列比对和系统进化分析使用 ClustalX 2.0.12 (<http://www.clustal.org/download/current/>) 和 MEGA 5.1 (<http://www.megasoftware.net/mega51.html>)。系统进化树构建使用 MEGA 5.1 软件中 Neighbor-joining 法(自展值为 1000)。

定量 PCR 分析利用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法计算目的基因的相对表达量(Livak *et al*, 2001)。实验数据采用 SPSS(17.0 版本)统计进行单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Duncan's 多重比较分析, 当 $P < 0.05$ 时为差异显著。

表 2 半滑舌鲷 *MCH1*、*MCH2* 和 β -actin 实时定量 PCR 用引物序列

Tab.2 Primers used in real-time PCR assays for *MCH1*, *MCH2* and β -actin of *C. semilaevis*

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	作用 Purpose
MCH1-DF	ATGCGTCCGTCCTGCTATC	<i>MCH1</i> Real-time PCR
MCH1-DR	TGTCGTCGTCCTTGGTCATC	
MCH2-DF	AGCCTGGGTTTCGTTACTGG	<i>MCH2</i> Real-time PCR
MCH2-DR	TTTCCGTCGTCCTGCTCTGTA	
β -actin-F	GTAGGTGATGAAGCCAGAGCA	β -actin Real-time PCR
β -actin-R	CTGGGTCATCTTCTCCCTGT	

2 结果

2.1 *pMCH* cDNA 序列结构分析

半滑舌鲷 *pMCH1* cDNA 序列长为 476 bp, 包括 405 bp 的开放阅读框(ORF)、71 bp 的 3'非编码区(3'-UTR), 编码 134 个氨基酸, 信号肽长为 24 个氨基酸(图 1), 成熟肽分子量为 14.8 kDa, 等电点为 6.46。*pMCH2* cDNA 序列全长为 626 bp, 包括 444 bp 的 ORF、32 bp 5'-UTR 和 150 bp 的 3'-UTR, 编码

147 个氨基酸, 信号肽长为 18 个氨基酸(图 1), 成熟肽的分子量为 16.2 kDa, 等电点为 5.89。

半滑舌鲷 *MCH* 2 个亚基序列的 C 端区域均有 1 个 RR 裂解位点, 其成熟肽序列中都包含有 2 个保守的环状结构, 由 2 个半胱氨酸残基相互间形成二硫键形成。*MCH1* 成熟肽含有 17 个氨基酸(DNMRCMVG-RVYRPECWEV), 而 *MCH2* 成熟肽则由 21 个氨基酸(ELDMLRCMIGRVYRPECWGTSN)组成, 这种氨基酸组成的差异提示其可能存在功能上的差异。

PMCH1

```

1 ATG CGT CCG TCA CTG CTA TCC GTG ATC TTC GCT GTC TCG CTC ATT TTC AAG TGC TAC GTG 60
1 M R P S L L S V I F A V S L I F K C Y V 20
61 CTC TCA GGC GCA CTG CCC ATG ATG ACC AAA GAC GAC AAC GCG TTA GAC CAG GAG ACA 120
21 L S G A L P M M T K D D D N A L D Q E T 40
121 TTT GCT TCG CTG CTG AGC GAT AAG GCG ACG GAA AAT GGC CTA GCT GAT GGA GAT CTG GGC 180
41 F A S L L S D K A T E N G L A D G D L G 60
181 GCA GAC CTG AAG GCG AGA GGC TCC AAG ATC ATC GTC GTG GCC AGC CCA AAC CTT TTG AGG 240
61 A D L K A R G S K I I V V A S P N L L R 80
241 GAC CTG CGG GTG CTG AAC GGT GGG ATG TCA CTG TAC AAG AGA CGA GCG GAC AAC CAG GTC 300
81 D L R V L N G G M S L Y K R R A D N Q V 100
301 TCC ACC GCT TCC GAC ACC AAC CAG GAC ATG GAC ATC CCC ATC CTG AGG AGG GAC AAC ATG 360
101 S T A S D T N Q D M D I P I L R R D N M 120
361 AGG (TGC) ATG GTG GGA CGA GTC TAC AGG CCG (TGC) TGG GAG GTG TAG GAC CGG GAG AGA GAG 420
121 R (C) M V G R V Y R P (C) W E V * 134
421 AGA GGC GTT CTC CAT GTC TTC ATC GTC CTC AAC ATC CTC CTA AATA AAC CCC CAA AA

```

PMCH2

```

-32 AC ATG GGG ATC AGC AGA TTC AGA GGC TCC ACC
1 ATG ATC TCC GTC TCC TCC GTC CTC ATC ACT TTG GTG CTG TCC TCA GTC CTG AGC AGC CAC 60
1 M I S V S S V L I T L V L S S V L S S H 20
61 CTA GTG GTC GTA GCC ATG CCC GAG ACC AAG GGA GAA GAT GCC ATG ATG GAG CAG GAC AGC 120
21 L V V V A M P E T K G E D A M M E Q D S 40
121 CTG GGT TCG TTA CTG GGG GAG GAG AGC CTG ACG GAC CGA GCC ATG CTT CCA TCA GCG TAT 180
41 L G S L L G E E S L T D R A M L P S A Y 60
181 GCT AAC GGC CTG ATG TTG AAC AAC TAC AGA GCA GAC GAC GGA AAC CCT AAC GTT CTA ATT 240
61 A N G L M L N N Y R A D D G N P N V L I 80
241 TTC TCG GAC ATG CGG CAA AAA GGA CAG GGC ATT CGT GGG CTG AGT CCA GGT TTT ACC CGA 300
81 F S D M R Q K G Q G I R G L S P G F T R 100
301 AGC CTT CCT CAA ATC ACA GAC CGA AAG ATG AAC CAG TCC CCG GGC GAA TAT AGT CTG AAA 360
101 S L P Q I T D R K M N Q S P G E Y S L K 120
361 ATG GAT CGA CGA AAC ACT GAA CTT GAC ATG CTG CGC (TGC) ATG ATA GGC AGA GTT TAC CGA 420
121 M D R R N T E L D M L R (C) M I G R V Y R 140
421 CCC (TGC) TGG GGA ACC TCC AAC TGA ACG CAT CAT CAA AAA TCC AAT ACC TTA TTG TTG TGT 480
141 P (C) W G T S N * 147
481 GTT TAG ATC TTT TTA TTC ATT TTC CTT GTA CAA ACA AAC AAT TGT GCA CAG AAC ATA AAA 540
541 CAA AAT AAA AAA TGT ATT TAA TCG TAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA 594

```

图 1 半滑舌鲷 *pMCH1* 和 *pMCH2* 基因的 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列Fig.1 Nucleotides and deduced amino acid sequences of *pMCH1* and *pMCH2* cDNA of *C. semilaievis*

虚线部分为信肽序列，实线部分为 MCH 成熟肽序列，3'-UTR 端 AATAA 序列以方框标注，终止密码子(TGA)以星号标注，圆圈部分为组成二硫键的半胱氨酸残基

Signal peptide was indicated by a broken underline; the mature peptide of MCH was indicated by an underline; the nucleotides corresponding to the polyadenylation signal in the 3'-untranslated region (AATAA) were marked with box; the asterisk indicated the stop codon (TGA); the cysteine residues to form disulfide linkage were circled

2.2 氨基酸序列同源性分析

半滑舌鲷 *MCH* 的氨基酸序列与鲈形目、鲑形目鱼类 *MCH* 的氨基酸序列的相似度最高为 57.3%–66.9%。其中，*pMCH1* 与牙鲆、条斑星鲈、星突江鲈、

罗非鱼等具有较高的氨基酸相似度(58.4%–66.9%)，与软骨鱼类的相似度为 37.3%，而与哺乳类的相似度降至 30%以下；*pMCH2* 基因的氨基酸序列与条斑星鲈、星突江鲈、牙鲆和布氏新亮丽鲷(*Neolamprologus*

brichardi)具有较高相似度(56.0%–61.3%),与哺乳动物的相似度降低到 25%以下,但与大鼠(*Rattus norvegicus*)的同源性却高达 53.7%(表 2)。MCH 2 个亚基间氨基酸相似度仅为 22.3%,但其成熟肽序列高度保守,C 端区域都具有保守的 RR 裂解位点,且都有 2 个保守的环状结构。

2.3 系统进化分析

半滑舌鳎 *pMCH1* 和 *pMCH2* 亚基分别处于 2 个不同的进化分支。*pMCH1* 与鲈形目、鲤形目和鲑形目鱼类的 *pMCH1* 处于同 1 个小分支,并与其他鱼类的 *pMCH1* 组成 1 个大分支;而 *pMCH2* 则与鲈形目、鲑形目鱼类的 *pMCH2* 组成 1 个小分支,并且与其他鱼类的 *pMCH2* 以及鸟类、哺乳类和人的 *MCH* 组成 1 个大分支(图 3)。表明 *MCH* 的 2 个亚基的进化分化时间可能比较早。

2.4 MCH mRNA 的组织表达特性

MCH1 和 *MCH2* 都在垂体中的表达量最高。另

外, *MCH1* mRNA 在脑、有眼侧皮肤、性腺、脾脏、肝脏和肠中检测到较高表达,而无眼侧黑化皮肤、无眼侧正常皮肤、心脏、头肾和鳃中表达量较低,肌肉中未检测到表达; *MCH2* mRNA 在脑、有眼侧皮肤、无眼侧正常皮肤、性腺和鳃中检测到较高表达,而无眼侧黑化皮肤、脾脏、肠、胃、心脏和头肾中有少量表达。有眼侧皮肤中 *MCH1* mRNA 表达显著高于无眼侧黑化皮肤和无眼侧正常皮肤,无眼侧黑化皮肤中 *MCH1* mRNA 表达显著高于无眼侧正常皮肤;有眼侧皮肤和无眼侧正常皮肤中 *MCH2* mRNA 表达显著高于无眼侧黑化皮肤(图 4)。

2.5 MCH mRNA 表达与无眼侧黑化程度的关系

检测了无眼侧黑化程度不同的半滑舌鳎脑垂体和皮肤中 *MCH* mRNA 的表达情况(图 5)。*MCH1* mRNA 在脑垂体和皮肤中表现出类似的表达变化趋势,都在 10%黑化组表达量达最高值,而后随着黑化程度的增加显著降低。对于 *MCH2* 而言,无眼侧正常鱼和无眼侧 50%黑化鱼的脑垂体中都具有较高

表 3 半滑舌鳎 *MCH* 氨基酸序列与其他脊椎动物的相似度比较

Tab.3 Homology comparison of the precursor peptide sequences of *MCH* genes between *C. semilaevis* and other vertebrates

物种 Species	序列号 GenBank Accession No.	同源性 Homology (%)	
		<i>pMCH1</i>	<i>pMCH2</i>
半滑舌鳎 <i>C. semilaevis</i> -1	XP_008322511.1	100	22.3
半滑舌鳎 <i>C. semilaevis</i> -2	XM_008315412.1	22.3	100
牙鲆 <i>P. olivaceus</i> -1	ABY73341.1	66.9	21.1
牙鲆 <i>P. olivaceus</i> -2	AAF67166.1	27.6	56.0
条斑星鲽 <i>V. moseri</i> -1	BAC82350.1	66.2	21.1
条斑星鲽 <i>V. moseri</i> -2	BAO58688.1	25.8	59.3
美洲拟鲽 <i>P. americanus</i> -1	AEE36642.1	37.3	12.2
美洲拟鲽 <i>P. americanus</i> -2	AEE36640.1	23.8	53.3
布氏新亮丽鲷 <i>N. brichardi</i> -1	XP_006803543.1	59.1	23.1
布氏新亮丽鲷 <i>N. brichardi</i> -2	XP_006780942.1	24.0	57.3
星斑川鲽 <i>P. stellatus</i> -1	AHB33367	61.8	23.1
星斑川鲽 <i>P. stellatus</i> -2	AHB33368.1	27.2	61.3
罗非鱼 <i>O. niloticus</i> -1	XP_003440133.1	58.4	21.1
罗非鱼 <i>O. niloticus</i> -2	XP_005475951.1	24.1	53.1
网纹鲈 <i>Poecilia reticulata</i> -1	XP_008422825.1	55.5	23.8
网纹鲈 <i>P. reticulata</i> -2	XP_008399128.1	25.7	40.1
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i> -1	XP_003965152.1	50.0	24.5
红鳍东方鲀 <i>T. rubripes</i> -2	XP_003972798.1	25.2	44.2
大马哈鱼 <i>O. keta</i> -1	P17640.1	42.9	27.2
大马哈鱼 <i>O. keta</i> -2	P69156.1	42.2	25.5
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	NP_001189471.1	25.7	23.2
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	AAA41580.1	23.6	53.7
鸡 <i>Gallus gallus</i>	ADL61813.1	18.8	21.1
路氏双髻鲨 <i>Sphyrna lewini</i>	BAM63324.1	37.3	24.8
人 <i>Homo sapiens</i>	AAA63214.1	23.0	21.8

NB2	-----MISVYSVFLTLLLFTELSHSHSVTVAMPATNAEDGTTEEDGLGLILGDESIIEPAVIPPVFR-----QRRIRDEEDGNP-TIIISDARLKHGHSVRGLNPAFTRS-----
ON2	-----MISVYSVFLTLLLFTELSHSHSVTVAMPATNAEGGITEEDGLGLILGDESIIEPAVIPPVFR-----RRRIRDEEDGNP-TIIISDARLKHGHSVRGLNPAFTRS-----
PS2	-----MISVSSVFLTLLVLFSELNSPLVTVASPTTKGEDGVTEQDGLSSFLGDEPMMEQAMVPPVYRGSMLMNSIRDEEGNPKIFILSDMRQKGGHTGRLNSGLTRS-----
PA2	-----MISFSSIVFTLLVLFSELNSPLVTVASPTTKGEDGVTEQDGLSSFLGDEPMMEQAMVPPVYRGSMLMNSIRDEEGNPKIFILSDMRQKGGHTGRLNSGLTRS-----
VM2	-----MISVSSVFLTLLVLFSELNSPLVTVASPTTKVEDGVTEQDGLSSFLGDEPMTEQAMVPPVYRGSMLMNSIRDEEGNPKIFIIISDMRQKGGHTGRLNSGLTRS-----
PO2	-----MVSAYSILFTLLVLFSELNSHLLTVASPATKVEDGETEQDGLSSFLGDDEPINEHAMVPPAYRGRMLMNSIRDEEDGNRKIIISDMRQKGGHTGRLNSGLTRS-----
CS2	-----MISVSSVFLTLLVLFSELSSHVVVAMPETKGEDAMMEQDGLSSFLGDESDTRAMLPASAYANGLMANN-TRADDGNPNVLIIFSDMRQKGGHTGRLNSGLTRS-----
TR2	-----MISASSFLYTLVLFSELSSRSVTVAMPAAKTED-----EGLGLLLGDE-----PAVPPVYRFR-----MDVQGSPPRDRGSKTIIVVSDPRLKGFHGQSPAFRLRS-----
PR2	-----MSFVSLFLSMLFSEMNSHLVTVAIPTSTTVEDGAAGQGLDTFLADDVTEHAHVPLMYRR-----SLTNDATSKIIIVSDMNLGEGRIIRGLK-----RR-----
DR	-----MASSYIIIFALALFVBLTTR-----SMALPKFKMDEEHTDQERMVSVTGEDDISELGPGQLPFRRHPIIEGRVLDVDEGDKRIFILADTGIKGG-----REGNLAFSRT-----
PS1	-----MRQSCVSVFAAALIFKCCVLSGALPMG-----KAEDGSLAQETFAAS-----TENGFSDADLAGEEKLSGPRVIVVA-DPSVWRDLRVLHNGLSLYKRRADLSD-----
PA1	-----MRQSCVSVFAAALIFKCCVLSGALPMG-----KAEDGSLAQETFAASLSDKATENSFSDADLAAEEKLSGPRVIVVA-DPSVWKS-RTLDN-----SR-----
VM1	-----MRQSFVSVFAAALIFKCYVLSGALPMA-----KTEDGSLAQETFAASLMSDKATENSFSDADLAAEEKLSGPRVIVVA-DPGLWRDLRVLHNGLSLYKRRADHSE-----
PO1	-----MRQSFMSIIFAALLFKCYVLSGALPMA-----RTEDGSLAQETFAASLSDKATENSFSDADLGTTEEKLSPRIIVVA-DPSMWRDLRVLHNGLSLYKRRADHSG-----
CS1	-----MRPSLSSVIFAVSLIFKCCVLSGALPMMT-----KDDNALDQETFAASLSDKATENSFSDADLADGLDADLKARGSKIIIVVA-SPNLLRDLRVLHNGLSLYKRRADN-----
NB1	-----MRQSRLSIIFAVALFFKCYALTYAVPTA-----KAEDGSLAQDFTSLLNDEATENSLGDALSYMTKSRAPKVIIVAAADANLWRDLRVHNGLSLYKRRVDENN-----
ON1	-----MRQSRLSIIFAVALFFKCYALTYAVPTA-----KAEDGSLAQDFTSLLNDEATENSLGDALSYMTKSRAPKVIIVAAADANLWRDLRVHNGLSLYKRRVDENN-----
PR1	-----MRRLSLSFTFAAALFLNLC-----KAIPMG-----KTEXGSLAQEVFPTSLNDEAEMGG-----DLGEAARARAPKVIIVAADPTIWRDLRVLQNGMSYKRRADSN-----
TR1	-----MRQSIITAVIFAALFFKCYVLSGALPMA-----KAEDNSLEQAFSSLSLEGLSALDEADLAGASKPRGQRVIVVA-GPSLWRT-----LHNG-----LYQKRSQSSN-----
OT1	-----MRHSVLSVIFAVSLIFKCCVLSGALPMA-----KMDVDALEQDFTSLNDEATENSLGDALSYMTKSRAPKVIIVAAADANLWRDLRVHNGLSLYKRRVDENN-----
OT2	-----MRDSVLSVIFALALFVBLTTR-----SMALPKFKMDEEHTDQERMVSVTGEDDISELGPGQLPFRRHPIIEGRVLDVDEGDKRIFILADTGIKGG-----REGNLAFSRT-----
RAT	MAKMSLSYVIMLAFSLFSLFSGILLASAKSIRNVED-DIVFNTFRMGKAFQKEDTAEKSVIAPSLQKNDSESGFMKDDDKTK-----NTGSKQNLVTHGLPLSLAVK-----PYLALKGPAVFP
Homo	MAKMSLSYVIMLAFSLFSLFSGILLASAKSIRNVED-DIVFNTFRMGKAFQKEDTAEKSVIAPSLQKNDSESGFMKDDDKTK-----NTGSKQNLVTHGLPLSLAVK-----PYLALKGPAVFP
Gallus	-----MYISVYSLI-----SLFSQGLISVSKSLQAEDDEMLLTAFLNCKTIRNGDGTERRGAMPLLKRYKIEES-FLDEDDDRKIKFFDTDSRIHDFSNHGVPSVGRKQLPYLALKGAIAPF
SL	-----MFIISVHAFFIFVLFSAEFSISSAVGQLEIKVPQNFQEMLASISLPEQLKPSGSIKHHQGLQDKGLDFKMDPKILQHSFLSASQRLFKHPSTLNKPKMEP-----LYFSAKRTDASQ

图 2 半滑舌鳎 MCH 氨基酸与其他脊椎动物 MCH 氨基酸序列比对

Fig.2 Comparison of the amino acid sequences of *C. semilaievis* MCH gene and other vertebrates

灰色为二元精氨酸残基组成的蛋白质水解切割位点; MCH 氨基酸序列号见表 3; “*”表示一致的氨基酸; “:”表示高度保守度的氨基酸; “.”表示低保守度的氨基酸; 在部分序列引入空白(连字符表示)来最大限度进行比对分析; NB1、NB2: 布氏新亮丽鲷; ON1、ON2: 罗非鱼; PS1、PS2: 星斑川鲈; PA1、PA2: 美洲拟鲈; VM1、VM2: 条斑星鲈; PO1、PO2: 牙鲆; CS1、CS2: 半滑舌鳎; TR1、TR2: 红鳍东方鲀; PR1、PR2: 网纹鲈; OT1、OT2: 大马哈鱼; DR: 斑马鱼; RAT: 褐鼠; Homo: 人类; Gallus: 鸡; SL: 路氏双髻鲨

The dibasic (RR) cleavages of various MCHs were shown in shadow; GenBank accession numbers are shown in Tab.3; Asterisks (*) indicated identical amino acid sequences; Dot (:) indicated highly conserved amino acid sequences; Dot (.) indicated amino acid sequences of low degree conserved; Gaps (indicated by hyphens) were introduced in some sequences to maximize alignment;

NB1, NB2: *N. brichardi*; ON1, ON2: *O. niloticus*; PS1, PS2: *P. stellatus*; PA1, PA2: *Pseudo-pleuronectes americanus*; VM1, VM2: *V. moseri*; PO1, PO2: *P. olivaceus*; CS1, CS2: *C. semilaievis*; TR1, TR2: *T. rubripes*; PR1, PR2: *P. reticulata*; OT1, OT2: *O. keta*; DR: *D. rerio*; RAT: *R. norvegicus*; Homo: *H. sapiens*; Gallus: *Gallus*; SL: *S. lewini*

mRNA 表达水平,但在无眼侧 10%黑化组和无眼侧 80%黑化组其表达水平显著降低。皮肤中 MCH2 的表达量表现出随黑化程度加大而显著增强的趋势,在无眼侧 80%黑化组则显著升高至最高值。

3 讨论

本研究获得了半滑舌鳎 pmCH2 的 cDNA 序列全长。结合 NCBI 数据库已有 pmCH1 序列, 比对分析了半滑舌鳎 2 个 MCH 亚基的结构, 发现其氨基酸同

源性仅为 22.3%, 特别是在成熟肽序列上差异明显, 表明其进化保守性较低, 其生理功能可能存在显著差异。系统进化分析表明, 半滑舌鳎 MCH 的 2 个亚基分别属于 2 个不同的进化分支, 表明其祖先基因复制分化的时间可能较早, 且朝两个不同方向进化, 其具体功能的差异尚需进一步研究确证。

本研究发现, 半滑舌鳎 MCH mRNA 在垂体中表达量最高, 这与美洲拟鲈(Tuziak et al, 2012)、星斑川鲈(Kang et al, 2013)和牙鲆(Jeon et al, 2003) MCH

mRNA 主要在脑和垂体中表达的研究结果相似。半滑舌鳎 *MCH1* mRNA 在除肌肉外的其他组织中均可检测到表达; *MCH2* mRNA 在脑、有眼侧皮肤、无眼侧正常皮肤、性腺和鳃也可检测到较高表达, 其他外围组织中微量表达, 这与牙鲆 *MCH* mRNA 的组织表达特性不同, 牙鲆 *MCH* mRNA 在除垂体外的其他组织

中没有检测到表达(Jeon *et al*, 2003)。而 Kang 等(2013)对星斑川鲷 *MCH* 的研究表明, 除垂体外, 只在鳃和精巢中检测到 *MCH1* mRNA 微量表达, 鳃、心、精巢中 *MCH2* mRNA 微量表达。在美洲拟鲷中则发现, *MCH1* mRNA 在除心和肝脏外的其他组织中均可检测到表达, *MCH2* mRNA 在所有组织中均检测到表

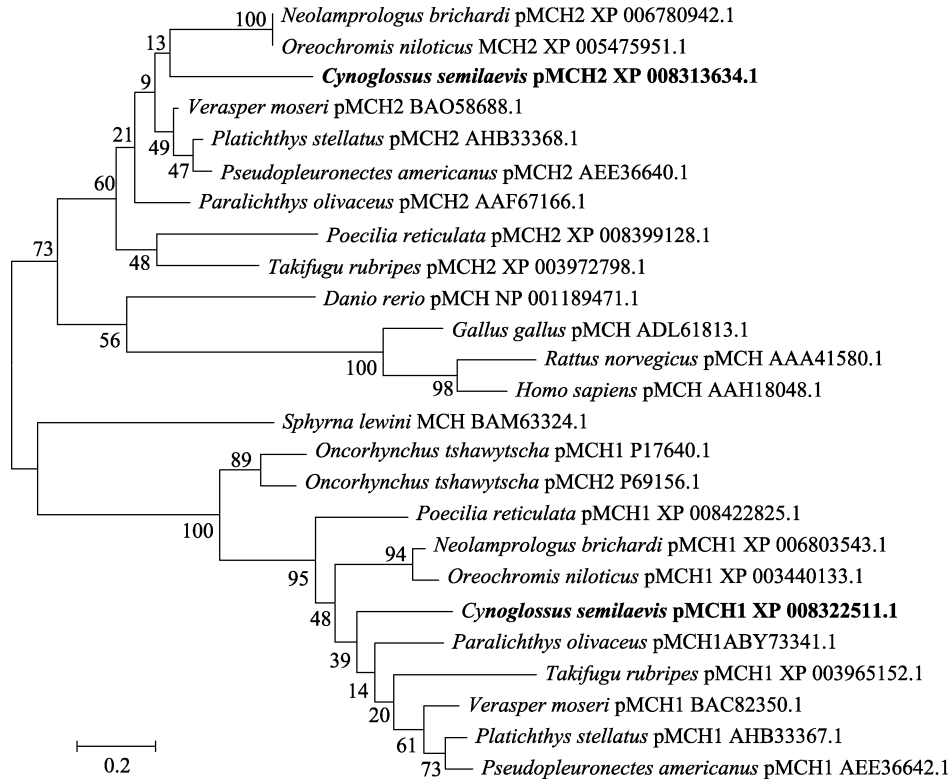


图 3 基于 *MCH* 氨基酸序列的 NJ 系统进化树
Fig.3 NJ phylogenetic tree based on the *MCH* amino acid sequences

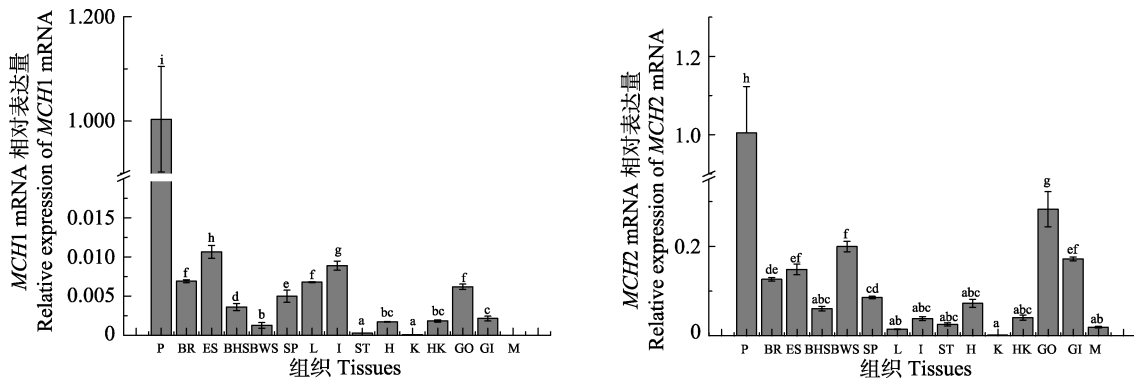


图 4 半滑舌鳎 *MCH* mRNA 的组织表达分析
Fig.4 Spatial expression pattern of *MCH* mRNA in *C. semilaevis*

P: 垂体; BR: 脑; ES: 有眼侧皮肤; BHS: 无眼侧黑化皮肤; BWS: 无眼侧正常皮肤; SP: 脾; L: 肝; I: 肠; ST: 胃; H: 心脏; K: 肾; HK: 头肾; GO: 性腺; GI: 鳃; M: 肌肉。不同字母代表差异显著($P < 0.05$), 下同
P: Pituitary; B: Brain; ES: Eye-side skin; BHS: Blind-side skin with hypermelanosis; BWS: Normal blind-side white skin; SP: Spleen; L: Liver; I: Intestine; ST: Stomach; H: Heart; K: Kidney; HK: Head kidney; GO: Gonad; GI: Gill; M: Muscle. Bars with different letters differed significantly ($P < 0.05$), the same as below

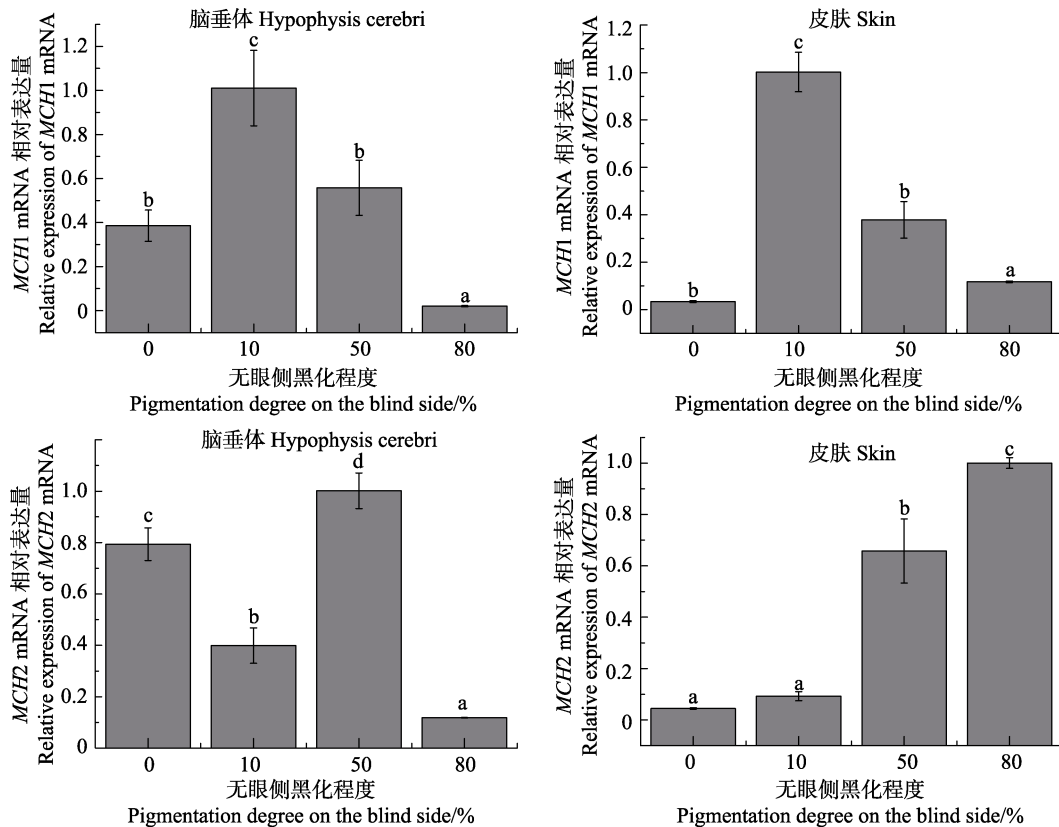


图 5 半滑舌鲷 *MCH* mRNA 表达与无眼侧黑化程度的关系

Fig. 5 The relationship between expression levels of *MCH* mRNA and pigmentation degree on the blind side of *C. semilaevis*

达, 而且生殖腺和内脏中表达量较高(Tuziak *et al.*, 2012), 这与本研究结果相似, 可能是由种的差异性及其生理功能的不同决定的。另外, 半滑舌鲷 *MCH* 的组织表达的广泛性, 也说明 *MCH* 除了内分泌外, 可能还以自分泌或旁分泌的形式参与半滑舌鲷其他生理活动的过程调控。近年来, *MCH* 被视为一种重要的生理调控因子而进行了许多的功能研究, 如摄食活动与体重(Kawano *et al.*, 2002)、睡眠与觉醒(Peyron *et al.*, 2009)和体内能量平衡(MacNeil *et al.*, 2013)等调节功能。

对牙鲆、星斑川鲷和星突江鲷的研究都表明, *MCH* 具有抑制无眼侧黑化发生和发育的生理调控作用(Kang *et al.*, 2013; Takanishi *et al.*, 2007; Takeshi *et al.*, 2007)。本研究分析了半滑舌鲷 2 种 *MCH* 亚基与无眼侧黑化程度的关系, 发现垂体和皮肤中 *MCH1* mRNA 在无眼侧黑化发生过程中表现出类似的变化趋势, 其表达水平都在黑化发生早期(无眼侧 10%黑化)达峰值, 但随着黑化程度的增加却显著降低, 表明无论垂体还是皮肤中的 *MCH1* 都主要参与了黑化的早期发生过程调控, 而随着黑化程度的增加其调控作用减弱, 其可能的机制值得今后深入解析。研究还发现,

半滑舌鲷无眼侧正常鱼和无眼侧 50%黑化鱼的脑垂体中都具有较高的 *MCH2* mRNA 表达水平, 但在无眼侧 10%黑化组和无眼侧 80%黑化组表达水平却显著降低, 表明垂体 *MCH2* 可能不是通过直接的内分泌途径参与调控无眼侧黑化过程, 可能有其他体色因子通过不同的信号途径参与了黑化的调控过程。而在皮肤组织中, 发现 *MCH2* mRNA 表达水平随黑化程度增加而显著升高, 并在无眼侧 80%黑化组显著升高至最高值, 表明皮肤 *MCH2* 对无眼侧黑化现象的发生和发展过程起到了关键的调控作用, 今后应深入开展其表达调控的相关机制研究, 进一步解析 *MCH2* 的生理功能。

参 考 文 献

- Amiya N, Amano M, Takahashi A, *et al.* Effects of tank color on melanin-concentrating hormone levels in the brain, pituitary gland, and plasma of the barfin flounder as revealed by a newly developed time-resolved fluoroimmunoassay. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 143(3): 251–256
- Baker B, Levy A, Hall L, *et al.* Cloning and expression of melanin-concentrating hormone genes in the rainbow trout brain. *Neuroendocrinology*, 1995, 61(1): 67–76

- Berman JR, Skariah G, Maro GS, *et al.* Characterization of two melanin-concentrating hormone genes in zebrafish reveals evolutionary and physiological links with the mammalian mch system. *Journal of Comparative Neurology*, 2009, 517(5): 695–710
- Deng JY, Meng TX, Ren SM, *et al.* Species composition, abundance and distribution of fishes in the Bohai Sea. *Marine Fisheries Research*, 1988, 9: 11–89 [邓景耀, 孟田湘, 任胜民, 等. 渤海鱼类种类组成及数量分布. *海洋水产研究*, 1988, 9: 11–89]
- Gröneveld D, Hut MJ, Balm PHM, *et al.* Cloning and sequence analysis of hypothalamus cDNA encoding tilapia melanin-concentrating hormone. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1993, 11(1–6): 117–124
- Jeon JM, Song YH. Cloning of melanin-concentrating hormone cDNA gene from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of the Korean Fisheries Society*, 2003, 36(5): 442–448
- Kang DY, Kim HC. Functional characterization of two melanin-concentrating hormone genes in the color camouflage, hypermelanosis, and appetite of starry flounder. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 189: 74–83
- Kawano H, Honma S, Hayashi A, *et al.* Melanin-concentrating hormone neuron system: The wide web that controls the feeding. *Anatomical Science International*, 2002, 77(3): 149–160
- Kawauchi H, Kawazoe I, Tsubokawa M, *et al.* Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature*, 1983, 305(5932): 321–323
- Liu XZ, Zhuang ZM, Ma AJ, *et al.* Operative technologies for seedling rearing of *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Marine Fisheries Research*, 2006, 27(2): 17–24 [柳学周, 庄志猛, 马爱军, 等. 半滑舌鳎苗种生产技术的开发研究. *海洋水产研究*, 2006, 27(2): 17–24]
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- MacNeil DJ. The role of melanin-concentrating hormone and its receptors in energy homeostasis. *Frontiers in Endocrinology*, 2013, 4: 49
- Minth CD, Qiu H, Akil H, *et al.* Two precursors of melanin-concentrating hormone: DNA sequence analysis and *in situ* and immunochemical localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989, 86(11): 4292–4296
- Mizusawa K, Kawashima Y, Sumuma T, *et al.* Involvement of melanin-concentrating hormone 2 in background color adaptation of barfin flounder *Verasper moseri*. *General and Comparative Endocrinology*, 2015, 214: 140–148
- Mizusawa KL, Saito Y, Wang Z, *et al.* Molecular cloning and expression of two melanin-concentrating hormone receptors in goldfish. *Peptides*, 2009, 30(11): 1990–1996
- Peyron C, Sapin E, Leger L, *et al.* Role of the melanin-concentrating hormone neuropeptide in sleep regulation. *Peptides*, 2009, 30(11): 2052–2059
- Takahashi A, Itoh T, Nakanishi A, *et al.* Molecular cloning of proopiomelanocortin cDNA in the ratfish, a holocephalan. *General and Comparative Endocrinology*, 2004, 135(1): 159–165
- Takahashi A, Kosugi T, Kobayashi Y, *et al.* The melanin-concentrating hormone receptor 2 (MCH-R2) mediates the effect of MCH to control body color for background adaptation in the barfin flounder. *General and Comparative Endocrinology*, 2007, 151(2): 210–219
- Takeshi Y, Masafumi A, Noriko A, *et al.* Hypermelanosis on the blind side of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* is diminished by rearing in a white tank. *Fisheries Science*, 2007, 73(2): 466–468
- Tuziak SM, Volkoff H. A preliminary investigation of the role of melanin-concentrating hormone (MCH) and its receptors in appetite regulation of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2012, 348(1): 281–296

(编辑 马瑾艳)

Cloning and Expression of Melanin-Concentrating Hormone in Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)

XU Yongjiang^{1,2}, ZHU Xuewu^{1,3}, LIU Xuezhou^{1,2①}, SHI Xueying^{1,3},
SHI Bao^{1,2}, WANG Bin^{1,2}, LI Bin^{1,3}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Hypermelanosis is an abnormal coloration that commonly occurs on the blind-side of half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* in captivity, resulting in deterioration in flesh quality and reduced market price. This problem has become the bottleneck for sustainable development of flatfish farming industry. Melanin-concentrating hormone (MCH) is produced in pituitary acting as an inhibitor for hypermelanosis in fish. The present study aims to identify the role of MCH in regulating the blind-side hypermelanosis in *C. semilaevis*. cDNAs encoding two *MCH* alleles (*pMCH1* and *pMCH2*) were cloned using RACE method and their structures were analyzed. The spatial and temporal expression patterns of *MCH* mRNA were measured using the quantitative real-time PCR. Results showed that *C. semilaevis pMCH1* cDNA sequence was 476 bp in length and encoded 134 amino acids, which shares high identity (66.9%) with *Paralichthys olivaceus*. *C. semilaevis pMCH1* was clustered with the Pleuronectiformes, Tetraodontiformes and Perciformes species based on the phylogenetic analysis. By contrast, *C. semilaevis pMCH2* cDNA sequence was 626 bp in length and encoded 147 amino acids. The transcript levels of both *MCH1* and *MCH2* had the highest expression level in pituitary compared to other tissues. *MCH1* mRNA was also detected among other tissues. Furthermore, *MCH2* mRNA was highly expressed in the brain, eye-side skin, blind-side skin, gonad and gill, whereas the peripheral tissue had relatively low expression level. Correlating the *MCH* mRNA expression levels and the degree of the blind-side hypermelanosis showed that, *MCH1* mRNA expression levels in the pituitary and skin had similar trends, which peaked when fish had about 10% blind-side hyperpigmentation, and then significantly reduced as the blind-side hypermelanosis level increased. For fish with normal blind-side coloration and 50% blind-side hyperpigmentation, their pituitary *MCH2* mRNA levels were significantly higher than those from fish with 10% and 80% blind-side hyperpigmentation. The skin *MCH2* mRNA level significantly increased with the increased hyperpigmentation degree on the blind-side of fish. The present study provides new insights into the mechanisms underlying the regulation of blind-side hypermelanosis in *C. semilaevis*.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; Melanin-concentrating hormone; Hypermelanosis on the blind-side; Expression regulation

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) 黑色素聚集素受体(MCHR)表达特性 及其与无眼侧黑化的关系*



史学营^{1,3} 柳学周^{1,2①} 石莹⁴ 徐永江^{1,2}
史宝^{1,2} 王滨^{1,2} 李斌^{1,3}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室
海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;
4. 青岛市渔业技术推广站 青岛 266071)

摘要 利用 cDNA 末端快速克隆技术(RACE)获得了半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) 2种黑色素聚集素受体(MCHR1 和 MCHR2)的 cDNA 全长序列,并采用定量 PCR 技术分析了 MCHR mRNA 的组织表达特性,研究了其与无眼侧黑化程度的关系。结果显示,半滑舌鳎 MCHR1 cDNA 序列全长为 1685 bp,开放阅读框(ORF)长为 1080 bp,编码 359 个氨基酸,与牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)同源性高达 83.3%。系统进化分析显示,半滑舌鳎 MCHR1 与鲭形目、鲈形目和鲈形目鱼类聚为 1 个小分支。MCHR2 cDNA 序列全长为 1626 bp,ORF 长为 1044 bp,编码 347 个氨基酸,与鲈形目同源性最高达到 90%以上。系统进化分析显示,半滑舌鳎 MCHR2 与鲈形目、鲈形目鱼类聚为 1 个小分支。MCHR1 mRNA 在鳃中表达量最高,而 MCHR2 mRNA 在有眼侧皮肤中表达量最高,性腺次之。另外, MCHR1 和 MCHR2 mRNA 在其他组织中均检测到表达,这表明半滑舌鳎黑色素聚集素(MCH)可能通过内分泌方式和各组织中的 MCHR 介导参与生理调控。不同黑化面积表达分析显示,在无眼侧黑化发生早期,脑垂体中 MCHR1 mRNA 显著升高,在无眼侧 50%黑化组达到峰值,皮肤中 MCHR1 mRNA 在无眼侧 10%黑化组显著升高,其后保持较高水平;脑垂体和皮肤中 MCHR2 mRNA 表达表现出一致的变化趋势,在无眼侧黑化发生早期都达到峰值,其后逐渐下降至相对较低水平。表明 MCHR 可能直接或通过其他信号通路参与了半滑舌鳎无眼侧黑化性状的调控过程。

关键词 半滑舌鳎; 黑色素聚集素受体; 基因克隆; 表达调控; 无眼侧黑化

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0091-12

黑色素聚集素(Melanin concentration hormone, MCH)是一种垂体神经肽,最早从大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*)的垂体中被分离鉴定(Kawauchi *et al*, 1983),具

有调节体色、色素沉着、摄食(Kang *et al*, 2013; Kawauchi, 2006)、能量平衡、压力、繁殖、行为、知觉和神经内分泌的作用(Kawauchi *et al*, 2004; Forray, 2003;

* 国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50)和国家国际科技合作专项(2013DFA31410)共同资助 [This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-50) and International Science and Technology Cooperation Program of China (2013DFA31410)]. 史学营, E-mail: shixueying0106@sina.com

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-11-05, 收修改稿日期: 2015-12-30

Griffond *et al.*, 2002; Pissios *et al.*, 2003)。在硬骨鱼类中, MCH 被认为是体色生理变化的一个关键调节因子(Kishida *et al.*, 1989; Suzuki *et al.*, 1995), 其通过 G 蛋白偶联受体(MCHR)发挥生理作用, 调节色素细胞内色素颗粒凝聚而使体色变浅。第 1 个 MCH 的受体 MCHR1 是在哺乳动物中发现的(Chambers *et al.*, 1999; Lakaye *et al.*, 1998; Lembo *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 1999)。随后, 在人类基因组数据中, 第 2 个受体 MCHR2 被鉴定, 并且从人脑 cDNA 文库中克隆获得(An *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 2001; Rodriguez *et al.*, 2001)。哺乳动物 MCHR 一般有 2 个亚型, 而啮齿动物只有 1 个 MCHR 亚型(Tan *et al.*, 2002)。硬骨鱼类, 如金鱼(*Carassius auratus*)(Mizusawa *et al.*, 2009)、条斑星鲃(*Verasper moseri*)(Takahashi *et al.*, 2009)和美洲拟鲃(*Pseudopleuronectes americanus*)(Tuziak *et al.*, 2012)等, 一般有 2 种 MCHR 亚型, 而在斑马鱼(*Danio rerio*)中发现了 3 种 MCHR 亚型: MCHR1a、MCHR1b 及 MCHR2。其中, MCHR1a 只在胚胎期表达, MCHR1b 和 MCHR2 在胚胎期和成体期都表达, 且 MCHR2 在成体期表达水平明显升高(Berman *et al.*, 2009; Logan *et al.*, 2003), 表明了其亚型基因功能的分化。MCHR1 与啮齿类动物摄食行为和体内能量平衡调控有关(Wang *et al.*, 2001)。在鱼类中, MCHR 与摄食行为和体色调控有关, 如饥饿条件下, 美洲拟鲃 MCHR2 mRNA 表达量无变化, 而 MCHR1 mRNA 表达量升高, 说明 MCHR1 参与了其摄食调节(Tuziak *et al.*, 2012)。Takahashi 等(2004)对条斑星鲃的研究表明, MCH 和 MCHR 相互作用调控黑色素颗粒的聚合。有眼侧皮肤在白色养殖环境下, MCHR2 mRNA 表达量低于黑色养殖环境, 而 MCHR1 mRNA 水平却没有变化, 表明 MCHR2 可能主要参与体色对环境的适应调节(Takahashi *et al.*, 2007)。目前, 鱼类 MCH 与 MCHR 系统对体色的调控作用及其机制仍不明了, 亟待开展深入的研究来阐释 MCHR 调节 MCH 作用的信号途径。

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)为我国鲆鲽类三大主导养殖品种之一, 已形成规模化养殖产业(姜言伟等, 1993; 邓景耀等, 1988; 柳学周等, 2014)。近年来, 在养殖生产中发现, 养殖鱼存在较高比例的无眼侧黑化现象(60%以上), 且无眼侧黑化鱼市场价格较无眼侧正常鱼低 20%–30%, 严重影响其养殖效益, 成为制约产业持续发展的瓶颈之一。开展半滑舌鲷无眼侧黑化调控机制研究已极为迫切。MCH 对硬骨鱼类特别是鲆鲽类无眼侧体色黑化具有明显的抑制作用, 因此, 有必要研究 MCH/MCHR 系统在养殖半滑舌鲷无眼侧黑化调控中的作用及其可能机制, 以

期为全面认识养殖半滑舌鲷无眼侧黑化的分子机制, 建立实用的体色调控技术提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 实验用鱼及样品处理

实验用半滑舌鲷于 2013 年 6–8 月取自山东青岛某养殖场。取样实验鱼 3 尾, 全长为 25–35 cm, 体重为 250–350 g, 用于 MCHR 基因克隆与组织表达特性分析。实验鱼以 MS-222 (280 mg/L)麻醉后, 快速取性腺、肝脏、心脏、胃、肠、脾、肾、头肾、垂体、脑、鳃、肌肉、有眼侧正常皮肤、无眼侧黑化皮肤、无眼侧正常皮肤组织投入液氮速冻后, 转入–80℃保存, 用于总 RNA 的提取。

选择同一批次受精卵孵化的鱼苗, 按照发育进程, 分别挑选无眼侧黑化面积为 10%、50%和 80%的半滑舌鲷各 3 尾, 以无眼侧正常半滑舌鲷为对照。实验鱼体长为 8–10 cm, 体重为 4–6 g, 每个黑化组分别取脑垂体与皮肤组织, 用于分析 MCHR mRNA 表达与无眼侧黑化程度的关系。因实验鱼个体较小, 取样时将脑与垂体合并取样, 皮肤组织(去除肌肉)整体取样。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 第 1 链合成

利用 RNAiso Plus (TaKaRa, 日本)试剂盒并按照操作说明提取各组织样品的总 RNA, 通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量, Nanodrop 2000 (Thermo, 美国)测定 RNA 浓度。取适量脑组织总 RNA, 以 PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)合成 cDNA 第 1 链, 于–20℃保存用于中间片段的克隆。以 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, 美国)合成 5'-RACE 及 3'-RACE cDNA 第 1 链, 用于 MCHR 基因 RACE 全长克隆。取适量各组织样品的总 RNA, 用 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒(TaKaRa, 日本)合成 cDNA 第 1 链, 用于 MCHR mRNA 组织表达特性及其与无眼侧黑化程度分析。各操作步骤均严格按照使用说明书进行。

1.3 中间片段扩增

根据 GenBank 登记的鲆鲽类 MCHR2 序列保守区设计特异引物 MCHR2-F 和 MCHR2-R (表 1), 以脑 cDNA 为模板, 扩增半滑舌鲷 MCHR2 基因的核心序列, PCR 反应体系(25 μl): 0.3 μl Taq 酶、2.5 μl 10× PCR Buffer、2 μl dNTP Mixture、1 μl 模板、1 μl MCHR2-F、1 μl MCHR2-R、17.2 μl ddH₂O。反应条

件: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 50 s, 34 个循环; 72°C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 切胶回收目的条带并纯化。回收 PCR 产物与 pEASY-T1 载体(全式金, 中国)连接, 转化至 Trans1-T1 感受态细胞(全式金, 中国), LB 固体培养基 37°C 培养过夜, 挑取阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序; *MCHR1* 的中间序列已在 NCBI 数据库登录(序列号: XM_008316788.1), 直接下载其序列用于 RACE 引物设计。

1.4 *MCHR* 的 RACE 扩增

根据 NCBI 数据库登记的 *MCHR1* 和 *MCHR2* 中间片段设计 RACE 引物 *MCHR1*-GSP1、*MCHR1*-GSP2、*MCHR1*-NGSP1、*MCHR1*-NGSP2、*MCHR2*-GSP1、*MCHR2*-GSP2、*MCHR2*-NGSP1、*MCHR2*-NGSP2(表 1), 用 Smart RACE Advantage 2 PCR 试剂盒(Clontech, 美国)进行梯度 PCR 扩增。第 1 次 PCR 使用引物 *MCHR1*-GSP1、*MCHR1*-GSP2 和 *MCHR2*-GSP1、*MCHR2*-GSP2, 反应体系: 17.25 μ l ddH₂O、2.5 μ l Buffer、0.5 μ l 50 \times dNTP Mix、0.5 μ l 50 \times Advantage 2 Polymerase Mix、1.25 μ l cDNA、2.5 μ l UPM 和 GSP 引物 0.5 μ l, 共计 25 μ l。PCR 反应条件为 94°C 30 s; 70°C 30 s, 16 个循环, T_m 每个循环降低 0.5°C, 72°C 延伸 1 min; 然后, 94°C 30 s, 63°C 30 s, 72°C 60 s, 28 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min。

以第 1 次 PCR 产物为模板, 使用引物 *MCHR1*-NGSP1、*MCHR1*-NGSP2 和 *MCHR2*-NGSP1、*MCHR2*-NGSP2 进行巢式 PCR, 反应体系: 1.25 μ l 第 1 次 PCR 产物的稀释液、19.25 μ l ddH₂O、2.5 μ l Buffer、0.5 μ l 50 \times dNTP Mix、0.5 μ l 50 \times Advantage 2 Polymerase Mix、0.5 μ l NUP、0.5 μ l NGSP 引物, 共计 25 μ l。PCR 反应条件同第 1 次 PCR。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 对目的条带进行胶回收、载体连接、转化、筛选阳性克隆并测序。

1.5 *MCHR* mRNA 定量表达分析

根据获得的半滑舌鲷 *MCHR1* 和 *MCHR2* 的 cDNA 序列设计定量 PCR 引物 *MCHR1*-DF、*MCHR1*-DR 和 *MCHR2*-DF、*MCHR2*-DR(表 1), 以 β -actin 为内参, 设计引物 β -actin-F 和 β -actin-R(表 1)(Li *et al.*, 2010)。利用 Mastercycler ep *realplex* real-time PCR 仪(Eppendorf, 德国), 使用 SYBR Premix Ex *Taq*TM II 试剂盒(Takara)进行定量扩增, PCR 体系(20 μ l)为 2 μ l cDNA 模板, 0.8 μ l 上、下游引物(10 μ mol/L), 10 μ l SYBR Premix Ex *Taq*TM II 和 6.4 μ l ddH₂O。PCR 反应条件为 95°C 预变性 30 s, 95°C 5 s, 58°C (*MCHR1*)、60°C (*MCHR2*) 20 s 共 40 个循环。每个样品测试设置 3 个重复。*MCHR* mRNA 的表达量以 β -actin mRNA 表达量为基础, 利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算获得(Livak *et al.*, 2001)。

表 1 半滑舌鲷 *MCHR* 基因克隆使用的 PCR 扩增引物序列

Tab.1 Nucleotide sequences of primers used for PCR amplification of *MCHR* of *C. semilaevis*

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	用途 Usage
MCHR2-F	ATCCTGTGCTCGGTTGGAGTTAT	中间片段克隆
MCHR2-R	GGAACCATCTGTTTTGACGACTG	
UPM-long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGC AGAGT	5'和 3'-RACE PCR
UPM-short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	5'和 3'-RACE 巢式 PCR
MCHR1-GSP1	CGTTGTAGGCGTAGTTGAAGGCGATG	5'-RACE PCR
MCHR2-GSP1	GGTGATGGTGGGCGTGTGTTGCT	
MCHR1-NGSP1	GCCAAAAGGAACTGATAAAGTGTGAACCA	5'-RACE 巢式 PCR
MCHR2-NGSP1	CTCTTCTCTGAGGTGGGGTGGACAAT	
MCHR1-GSP2	TCCATCGCCTCAACTACGCCTAC	3'-RACE PCR
MCHR2-GSP2	CAGTGGGTCTTTGGGAACCTTATGTGTA	
MCHR1-NGSP2	CGAGTGAACCCAGTAAGACCCGACG	3'-RACE 巢式 PCR
MCHR2-NGSP2	GTTCTGATTTGCTGGTCCGCCTAC	
MCHR1-DF	CCAATCCGCTTCGACTACAT	MCHR1 qPCR
MCHR1-DR	GACCGGCGTACATCAACAC GTGCATGATGTGGCTGGAC	MCHR2 qPCR
MCHR2-DF	GTGGTAGAGGGTGAGGGAGTAGAA	
MCHR2-DR		
β -actin-F	GTAGGTGATGAAGCCCAGAGCA	β -actin qPCR
β -actin-R	CTGGGTCATCTTCTCCCTGT	

1.6 序列分析及数据处理

半滑舌鲷 *MCHR* 基因的序列拼接、氨基酸序列推导、分子量预测、等电点预测及氨基酸同源性分析均使用 DNASTar 5.0.1, 信号肽预测使用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。氨基酸序列比对和系统进化分析使用 ClustalX 2.0.12 (<http://www.clustal.org/download/current/>)和 MEGA 5.1 (<http://www.megasoftware.net/mega51.html>)。蛋白结构预测使用 SWISS-MODEL(<http://www.swissmodel.expasy.org/>)。

实验数据均以平均值±标准差(Mean±SD)表示, 多组数据间比较采用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Duncan's 多重比较分析, 当 $P < 0.05$ 时表示差异显著。

2 结果

2.1 *MCHR* cDNA 序列结构

半滑舌鲷 *MCHR1* cDNA 序列全长为 1685 bp, 包括 262 bp 的 5'非编码区(UTR)、1080 bp 的开放阅读框(ORF)和 343 bp 的 3'UTR, 编码 359 个氨基酸。N 端第 1-30 位氨基酸为信号肽序列, 7 个糖基化位点分别位于第 5、8、15、72、94、222 和 324 位氨基酸。存在 7 个跨膜结构域, 分别位于 29-51、68-90、105-127、147-169、195-217、246-268 和 283-302 位氨基酸。3'端 UTR 含有 1 个加尾信号 AATTAA (图 1)。编码蛋白预测分子量为 39.9 kDa, 等电点为 9.00。

```

-262          A CAT GGG ACA CGG ACG AGG ACA
-240 GCG GCC AGT GCG GAG TGA GCG CAG CTC GGA TGC CAG TGA AGA TGC TCC TGA CTG GGA GAG
-180 GCT TGT TTA TGG CTG CAG GAG CAG AGC CGC TCT CTC ACA CAC GGA CTC AGG CAC AAT GCA
-120 AAA GGA CTG GAA TCA CTC CTG AAG AGT AGC AGG GAA CTC CAG GCG CTC ACA CCT TGC CCT
-60 TCA AGG ACA GAC AGC TGT ATT ATT AAC ACT TGG AAC TTG GAT TTT TTT CCT GTT TCC TCC
1 ATG GAT TTG TAC AAC GAC TCC AAT TCT TCC CTC GCA GAC AGT AAT TTA ACT ACA CGG GTT
1 M D L Y N D S N S S L A D S N L T T A V
61 GTC AAC GGA GCT CTT TAC TCC AGC GCC ATC CTC CCT GTC ATT TAT GGC ATC ATA TGT TTC
21 V N G A L Y S S A I L P V I Y G I I C F
121 CTG GGG ATC ATC GGG AAC TGC ATC GTC CTC TAC ACC ATC ATG AAG AAG AAC AAG TGC CAC
41 L G I I G N C I V L Y T I M K K N K C H
181 GCT AAA CAA ACC GTG CCG GAC ATC TTC ATC TTA AAC CTG TCC ATC GTC GAC CTC CTG TTC
61 A K Q T V P D I F I L N L S I V D L L F
241 CTC CTC GGG ATG CCA TTT CTC ATC CAC CAG TTG CTG GGC AAT GGC AGC TGG CAC TTC GGC
81 L L G M P F L I H Q L L G N G S W H F G
301 GGT CCG ATG TGT ACA GTC ATC ACC GCA CTC GAC TCC AAC AGC CAG ATT GTC AGC ACC TAC
101 G P M C T V I T A L D S N S Q I V S T Y
361 ATC CTC ACC GCC ATG GCC CTC GAT CGC TAC CTG GCT ACG GTG CAT CCA ATI CGC TTC GAC
121 I L T A M A L D R Y L A T V H P I R F D
421 TAC ATC CGC ACC CCC TGC GTG GCC GCG CTG GTC ATC GTG ATG GTG TGG TGT GTG TCC TTC
141 Y I R T P C V A A L V I V M V W C L S F
481 TTC ACC ATC ATC CCC GTG TTG ATG TAC GCC GGT CTG ATG CCG CTG CCG GAC GGC CTG GTG
161 F T I I P V L M Y A G L M P L P D G L V
541 GCC TGC GCT CTG CTC CTG CCC GAC CCG GTC ACC AGC ACA TAC TGG TTC ACA CTT TAT CAG
181 A C A L L L P D P V T S T Y W F T L Y Q
601 TTC CTT TTG GCC TTT GCC ATG CCG CTG GCC ATA ATC TGC CTG GTG TAC TTT AAA ATC CTC
201 F L L A F A M P L A I I C L V Y F K I L
661 CAG AAC ATG TCC ACC AGC GTG GCA CCA CTG CCT CCA CGG AGT TTG AGG GTG CCG AC AGG
221 Q N M S T S V A P L P P R S L R V R T R
721 AAG GTG ACC CGC ATG GCG GTG GCG ATA TGC CTG GCC TTC TTC GTC TGC TW GCT CCG TAC
241 K V T R M A V A I C L A F F V C W P Y
781 TAC ACC CTC CAG TTG GTG CAC CTG GGC GTG CAG AAG CCG TCC ATC GCC TTC AAC TAC GCC
261 Y T L Q L V H L G V Q K P S I A F N Y A
841 TAC AAC GTT GCC ATC AGC ATG GGC TAC GCC AAC AGC TGC ATC AAC CCC TTC ATC TAC ATC
281 Y N V A I S M G Y A N S C I N P F I Y I
901 ACA CTC AGT GAC ACC TTC AAA AGG CAG TTT CTG AGA GCC GTG CAT CCG ATT AAC AGG AAG
301 T L S D T F K R Q F L R A V H P I N R K
961 TTC CGA GTG AAC CCC AGT AAG ACC GAC GCA GGC AGC GTC AGC ATG CAA ATG GTC CCC GAG
321 F R V N P S K T D A G S V S M Q M V P E
1021 GGC GTC CGG CCC GAG CCG GCC CCG CCG GAC ATG ATA CCA TCC AAT CTG GTT TCT CAG TGA
341 G V R P E P A P R D M I P S N L V S Q *
1081 ATG TCA ATC TCT GTT TTT ACA ATC AGA CAA TCA TTC TGC AGT TTC TCC ACC CAA AAC AAA
1141 ACA GAA TTG TCT TTT TTT TTC TTT TTT TTT TTT GGA GAT GAT CCG GTC TAT ATT TGA
1201 CAG TTC TAC GAT TAT TAA AAA TAG GAA ACA CAC TGA CGT GTC TGG AGC CCG TGT GTA GTA
1261 AAA GAA AAT TAA CCT AGT TCT CTT AGT TAT TTT TAC AAT CAC AGT TAA TGT GTA ACC ACC
1321 CAC AGA GAC TCC AGG AGG CCG TGT AAC TGT TCA TGG AAA AAT ATA TTT TCT TGC CAG TAG
1381 TAA CTG TAG ATT TAC AGA GGA AAA AAA AAA AAA AAA AAA A

```

图 1 半滑舌鲷 *MCHR1* 基因 cDNA 全长序列及推导的氨基酸序列

Fig.1 The full-length cDNA sequence of *C. semilaepis MCHR1* gene and deduced amino acid sequence

推导的氨基酸序列用单字母表示, 从阴影显示的起始甲硫氨酸开始计数。信号肽用单下划线表示, 糖基化位点以粗体表示, 跨膜螺旋用斜体表示, AATTAA 加尾信号用框表示, 终止密码子(TGA)用*表示。下同

The deduced amino acid residues were represented as single letter abbreviations and numbered from the initiating methionine which was shadowed. The signal peptide was underlined. The potential glycosylation sites were bolded. The transmembrane helices were italicized. The AATTAA sequence that indicated the polyadenylation signal was boxed. The boxed stop codon was marked by an asterisk. The same as below

半滑舌鳎 MCHR2 cDNA 序列全长为 1626 bp, 包括 213 bp 的 5'UTR、1044 bp 的 ORF 和 369 bp 的 3'UTR, 编码 347 个氨基酸。N 端第 1–47 位氨基酸为信号肽序列, 4 个糖基化位点分别位于第 2、11、15 和 23 位氨基酸, 存在 7 个跨膜结构域, 位置分别为 41–63、76–98、118–140、152–174、204–226、247–269 和 282–304 位氨基酸。3'UTR 区含有 1 个加尾信号 AATAA (图 2)。编码蛋白预测的分子量为 39.8 kDa, 等电点为 9.16。

2.2 MCHR 的氨基酸序列同源性比较

同源性分析显示, 半滑舌鳎 MCHR1 的氨基酸序列与鲽形目、鲈形目的相似度达 81.8%–83.3%, 与牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的相似度为 83.3%, 与爬行类、鸟类和人的相似度分别为 63.5%、62.2%和 14.1%。半滑舌鳎 MCHR2 的氨基酸序列与鲽形目的相似度达到 90%以上, 与鲤形目鱼类相似度为 33.0%–75.7%,

而与爬行类、鸟类和人的相似度分别仅为 33.6%、29.6%和 34.2%。另外, 半滑舌鳎 MCHR1 和 MCHR2 的氨基酸序列相似度仅为 30.1%(表 2)。

利用 ClustalX 2.0.12 对半滑舌鳎 MCHR 的氨基酸序列与其他物种的 MCHR 氨基酸序列进行了比较(图 3)。结果发现, 半滑舌鳎与其他鱼类 MCHR 的氨基酸序列保守性较强, 仅在 C 端和 N 端删除了一些氨基酸, 中间部分较为保守。

2.3 MCHR 系统进化分析

构建了半滑舌鳎 MCHR 和其他脊椎动物 MCHR 的系统进化树(图 4), 半滑舌鳎 MCHR1 与鲽形目、鲈形目鱼类聚为 1 个小分支, 与其他硬骨鱼类和鸟类、爬行类、人类聚为 1 个大分支; 半滑舌鳎 MCHR2 与鲽形目聚为 1 个小分支, 与其他硬骨鱼类聚为 1 个大分支, 与 MCHR1 遗传距离较大, 分别向 2 个方向进化。

-213	ACA TGG GGA TTC TGC TGC AGT TTG TCT TCA CAG
-180	AGT CAC ACG GCT GAG ATG ATC AGC CTG GAG CCC GTG CTC CGG TCG CTG GGG TTT TAT ATT
-120	TGA GTT TCA GAG GAG AAC CGC TGC CGT CCA GCA GGG AGT GCG CGC ACT TGG AGA GTG CGT
-60	AAA TCT GCT GTC CAA CTT TGG GAA GCG GAG CGC GCG CGC GTC TGG AAC GAG GAC CCG AAG
1	ATG AAC GAC TCC GGG GTG TTC TGC AAA GGC AAC CAG TCG GAC AAC ATG ACA GAG CCG TCA
1	M N D S G V F C K G N Q S D N M T E P S
61	TGT CTG AAC TCG ACT CGG CCG ACG TAC AAC CAC ATC GAC ATC ACC ACC TTC ATG CAC ATC
21	C L N S T R P T Y N H I D I T T F M H I
121	TTC CCC ICC ATC TAC GGC ATC CTG TGC TCG GTC GGA GTG ATT GCC AAC GGA CTG GTC ATT
41	F P S I Y G I L C S V G V I A N G L V I
181	TAC GCG GTG GCG GCG TGC AAG AAG AAG ATG GTG TCC GAC ATC TAC GTG CTG AAC CTG GCC
61	Y A V A A C K K M V S D I Y V L N L A
241	ATA GCC GAC ATG CTG TTC CTG CTG GTG ATG CCC TTC AAC ATC CAC CAG CTG GTC AGG GAC
81	I A D M L F L L V M P F N I H Q L V R D
301	AGA CAG TGG GTC TTT GGG AAC TTT ATG TGT AAA GCG GTT GTG GTG GAC CTG AGT AAC
101	R Q W V F G N F M C K A V V V V D V S N
361	CAG TTC ACC ACC GTG GGG ATT GTT ACT GTG CTG TGC ATT GAT CGG TAC ATA GCC ATT GTC
121	Q F T T V G I V T V L C I D R Y I A I V
421	CAC CCC ACC TCA GAG AAG AGG ACC ATC CAC TGG ACC ATC ATA ATC AAC ACA CTG GTG TGG
141	H P T S E K R T I H W T I I I N T L V W
481	GTG GGC AGC TTC CTC CTC ACC GTG CCG GTC ATG ATG TAC GCC AGG GTG GAG CGC AAG CAG
161	V G S F L L T V P V M M Y A R V E R K Q
541	CAC ATG GAG GTG TGC ATG ATG TGG CTG GAC GGT CCC GAG GAC ATG TAC TGG TAC ACC TTC
181	H M E V C M M W L D G P E D M Y W Y T F
601	TAC CAG TCC ATC CTG GGC TAC ATC ATT CCT CTC ATC ATC AGC ACC TTC TAC TCC CTC
201	Y Q S I L G Y I I P L I I I S T F Y S L
661	ACC CTC TAC CAC GTC TTC AGC TCC GTC CGC CGC GTC AAA CGC AAG CAG ACG GTT TGG GCT
221	T L Y H V F S S V R R V K R K Q T V W A
721	AAA CGG GCC ACC AAG ATG GTG CTG ATG GTA ATT GCA TTG TTC CTG ATT TGC TGG TCG CCC
241	K R A T K M V L M V I A L F L I C W S P
781	TAC CAT GTC ATT CAA GTG ATC AAC CTG AGC AAC AAC ACG CCC ACC ATC ACC TTC GTA TAT
261	Y H V I Q V I N L S N N T P T I T F V Y
841	GTC TAC CAC ATC AGC ATC TGC CTG AGC TAC TCC CAC AGC TGC ATC AAC CCG CTC ATG CTG
281	V Y H I S I C L S Y S H S C I N P L M L
901	CTC ATC TTC GCC CAG AAC TAT CGC GAC CGC CTC TGT CGC AGA AAC GCC CCG CAC AGC TCC
301	L I F A Q N Y R D R L C R R N A P H S S
961	CAG CAC TCC TCC AAG CTC ACG GTG GTC AAA ACG GAT GGT TCC AGC GTA ACC AGT AAC CCC
321	Q H S S K L T V V K T D G S S V T S N P
1021	AAC TAC CGC TGC ACG GTT GTG TGA AAC GTT GTA GAT ATT TAT GTA AAC GCT TTG ATG CCG
341	N Y R C T V V *
1081	ACT TCA AAA TGA CTC GCG GTG ATG AGA AGT GTC GGC CGT GAA ATC ACA CCC TGG GTG TTT
1141	CCA CAA TTG TAA ATG ACT GAA AGG AGA GTG GGT GCA CAG CAC CAT CAT CAT CAT CAT
1201	CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT
1261	CAT CAT CTT CAT CTT CAT CAT CAT CAG CTG CAG TAA GAG TAA ACA TGA CTG AAA GAC
1321	ATG AAC CTC AGG TCG CAC CAA AGG TTT GTT TTT ACA GAA TAA AGG AAG GTG ACC TTC TCC
1381	AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA

图 2 半滑舌鳎 MCHR2 基因 cDNA 全长序列及推导的氨基酸序列

Fig.2 The full-length cDNA sequence of *C. semilaevis* MCHR2 gene and deduced amino acid sequence

表 2 半滑舌鳎 *MCHR* 氨基酸序列与其他脊椎动物的同源性比较
 Tab.2 Comparison of homology of the precursor peptide sequences of *MCHR* gene between *C. semilaevis* and other vertebrates

物种 Species	序列号 GenBank accession no.	与 MCHR1 同源性 Homology with MCHR1 (%)	与 MCHR2 同源性 Homology with MCHR2 (%)
半滑舌鳎 <i>C. semilaevis</i> -1		100.0	30.1
半滑舌鳎 <i>C. semilaevis</i> -2		30.1	100.0
牙鲆 <i>P. olivaceus</i> -1	ACJ45803.1	83.3	31.6
牙鲆 <i>P. olivaceus</i> -2	ACJ45804.1	30.3	91.0
条斑星鲽 <i>V. moseri</i> -1	BAF49517.1	81.8	31.4
条斑星鲽 <i>V. moseri</i> -2	BAF49518.1	30.7	91.6
美洲拟鲽 <i>P. americanus</i> -1	AEE36641.1	6.5	13.8
美洲拟鲽 <i>P. americanus</i> -2	AEE36643.1	12.3	9.5
布氏新亮丽鲷 <i>Neolamprologus brichardi</i> -1	XP_006787523.1	81.8	32.0
布氏新亮丽鲷 <i>N. brichardi</i> -2	XP_006781728.1	5.5	10.5
罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i> -1	XP_003447997.1	81.8	32.0
罗非鱼 <i>O. niloticus</i> -2	XP_003445904.1	31.0	87.3
网纹鲈 <i>Poecilia reticulata</i> -1	XP_008412904.1	80.1	31.9
网纹鲈 <i>P. reticulata</i> -2	XP_008418194.1	30.7	84.4
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i> -1	XP_003972036.1	76.4	32.7
红鳍东方鲀 <i>T. rubripes</i> -2	XP_003970585.1	29.9	81.0
斑点雀鲷 <i>Lepisosteus oculatus</i> -1	XP_006635517.1	68.9	31.9
斑点雀鲷 <i>L. oculatus</i> -2	XP_006631982.1	31.1	71.8
鲫鱼 <i>Carassius auratus</i> -1	BAH70338.1	66.9	31.3
鲫鱼 <i>C. auratus</i> -2	BAH70339.1	32.4	75.5
斑马鱼 <i>D. rerio</i> -1a	XP_001343144.1	67.7	30.0
斑马鱼 <i>D. rerio</i> -1b	XP_692413.3	66.0	30.7
斑马鱼 <i>D. rerio</i> -2	XP_001921716.2	34.3	33.0
扬子鳄 <i>Alligator sinensis</i> -1	XP_006018414.1	63.5	28.7
扬子鳄 <i>A. sinensis</i> -2	XP_006020523.1	33.7	33.6
鸡 <i>Gallus gallus</i> -1	XP_004946431.1	62.2	29.6
人 <i>Homo sapiens</i> -1	CAC16691.1	14.1	14.7
人 <i>H. sapiens</i> -2	AAK32193.1	34.1	34.2

2.4 *MCHR* mRNA 的组织表达特性

半滑舌鳎 *MCHR1* mRNA 在鳃中表达量最高, 有眼侧皮肤、性腺、脾脏和无眼侧正常皮肤中检测到较高的表达量, 而垂体、脑、无眼侧黑化皮肤、肝、肠、心脏中表达量较低, 胃、肾、头肾、肌肉中检测到微量表达; 半滑舌鳎 *MCHR2* mRNA 在有眼侧皮肤中表达量最高, 性腺次之, 而在垂体、脑、无眼侧黑化皮肤、无眼侧正常皮肤和头肾中有少量表达, 在肝、肠、胃、肾、肌肉、心脏和脾脏中微量表达(图 5)。 *MCHR* 在性腺中的高表达表明其可能会参与生殖活动调控。另外, 有眼侧皮肤中这 2 种 *MCHR* 亚基表达水平均显著高于无眼侧黑化和正常皮肤, 而无眼侧黑化皮肤中, *MCHR1* 表达显著低于无眼侧正常皮肤, 无眼侧

黑化皮肤中 *MCHR2* 则显著高于无眼侧正常皮肤, 表现出差异表达特性。

2.5 *MCHR* mRNA 表达调控与无眼侧黑化程度的关系

本研究分析了半滑舌鳎脑垂体和皮肤中 *MCHR* mRNA 表达与无眼侧黑化程度的关系(图 6)。无眼侧黑化发生早期, 脑垂体中的 *MCHR1* mRNA 显著升高, 在无眼侧 50%黑化组达峰值, 其后又显著降低; 皮肤中的 *MCHR1* mRNA 在无眼侧 10%黑化组显著高于对照组, 其后保持较高表达水平。脑垂体和皮肤中的 *MCHR2* mRNA 表达表现出一致的变化趋势, 在无眼侧黑化发生早期(10%黑化组), 垂体和皮肤中的 *MCHR2* mRNA 都达到峰值, 随后逐渐下降至相对较低水平。

AS2	-----MNEIQAAWNSPTDPLFNKSW-----GHHYQVISAEE-----TIIILPSLIGIICSTGLIGNLIVITTIIRTK-----KKSIPDPIYICNLAIDLVHIIIGMPFL
Homo2	-----MNPFFHASCWNISAEALLNKSNW-----KEFAFQIASSVD-----TKVLPMSMIGICSTGLVGNLIVITTIIRSR-----KRVTPDPIYICNLAIDLVLVGMGPF
DR2	-----MNAVLELPEVWVNFNLPKDFNGTRANETAGHPADEYVIVHVITE-----TRILLPAFIFGLCESTGLVGNLIVITLIRSA-----KKTVPDPIYICNLAIDLVLVGMGPF
PA2	-----MNDTGLPCRNQNTANLTDPAACLN-----STRPFSYHIDITTSF-----MHIFPTIYVGLICSVGVIANGLVIVAAVAAK-----KKMVSIVLVNLAIDLVLVGMGPF
VM2	-----MNDTGLPCRNQNTANLTDPAACLN-----STRPFSYHIDITTSF-----MHIFPTIYVGLICSVGVIANGLVIVAAVAAK-----KKMVSIVLVNLAIDLVLVGMGPF
PO2	-----MNDTGLPCRNQNTANLTDPAACLN-----STRPFSYHIDITTSF-----MHIFPTIYVGLICSVGVIANGLVIVAAVAAK-----KKMVSIVLVNLAIDLVLVGMGPF
CS2	-----MNDTGLPCRNQNTANLTDPAACLN-----STRPFSYHIDITTSF-----MHIFPTIYVGLICSVGVIANGLVIVAAVAAK-----KKMVSIVLVNLAIDLVLVGMGPF
NB2	-----MNDTGLPCRNQNTANLTDPAACLN-----STRPFSYHIDITTSF-----MHIFPTIYVGLICSVGVIANGLVIVAAVAAK-----KKMVSIVLVNLAIDLVLVGMGPF
ON2	-----MNDTGLPCRNQNTANLTDPAACLN-----STRPFSYHIDITTSF-----MHIFPTIYVGLICSVGVIANGLVIVAAVAAK-----KKMVSIVLVNLAIDLVLVGMGPF
PR2	-----MNDTGLPCRNQNTANLTDPAACLN-----STRPFSYHIDITTSF-----MHIFPTIYVGLICSVGVIANGLVIVAAVAAK-----KKMVSIVLVNLAIDLVLVGMGPF
TR2	-----MNDTGLPCRNQNTANLTDPAACLN-----STRPFSYHIDITTSF-----MHIFPTIYVGLICSVGVIANGLVIVAAVAAK-----KKMVSIVLVNLAIDLVLVGMGPF
CA2	-----MNDTGLPCRNQNTANLTDPAACLN-----STRPFSYHIDITTSF-----MHIFPTIYVGLICSVGVIANGLVIVAAVAAK-----KKMVSIVLVNLAIDLVLVGMGPF
LO2	-----MNDTGLPCRNQNTANLTDPAACLN-----STRPFSYHIDITTSF-----MHIFPTIYVGLICSVGVIANGLVIVAAVAAK-----KKMVSIVLVNLAIDLVLVGMGPF
AS1	-----MNTSDILCAS-EFANSSNFSCYN-----RTTSPYSYIIDIASF-----MHIFPTIYVGLICSVGVIANGLVIVAAVAAK-----KKMVSIVLVNLAIDLVLVGMGPF
LO1	-----MNTSDLLCKYDEQVNTQNSCYTN-----KTLRDTMMLTSL-----MHVFPYVGLICTIGVINSNLVIVAAVAAK-----KKMVSIVLVNLAIDLVLVGMGPF
Gal1us	-----MTPRPHIDWHLIQARQTQCTCP1PGDIFSRQWMAER-PAPYT-----NVIMPFLSFIICFLGVGNLIVITTYIVKVKKLRKQVTPDIFIFNLSIVDILLFLLGMPFL
LO1	-----MAP-----INSLINPST-----EARGNSVAEK-PAPYT-----NVIMPFLSFIICFLGVGNLIVITTYIVKVKKLRKQVTPDIFIFNLSIVDILLFLLGMPFL
NB1	-----MTYVN-----SSLSYKNSV-----SSNQTAERGHAPYT-----DVIMPSIHIVICFSGSIIIGNCIIVTYIVKTKTKRAKQVTPDIFIFNLSIVDILLFLLGMPFL
ON1	-----MDFNNTNFS-----IDGNSST-AEDGALHC-----GAILPVIFGIICFLGIIGNCIVMYTIIMKTKCKRAKQVTPDIFIFNLSIVDILLFLLGMPFL
PR1	-----MDFNNTNFS-----IDGNSST-AEDGALHC-----GAILPVIFGIICFLGIIGNCIVMYTIIMKTKCKRAKQVTPDIFIFNLSIVDILLFLLGMPFL
VM1	-----MDFNNTNFS-----IDGNSST-AEDGALHC-----GAILPVIFGIICFLGIIGNCIVMYTIIMKTKCKRAKQVTPDIFIFNLSIVDILLFLLGMPFL
CS1	-----MDFNNTNFS-----IDGNSST-AEDGALHC-----GAILPVIFGIICFLGIIGNCIVMYTIIMKTKCKRAKQVTPDIFIFNLSIVDILLFLLGMPFL
TR1	-----MDFNNTNFS-----IDGNSST-AEDGALHC-----GAILPVIFGIICFLGIIGNCIVMYTIIMKTKCKRAKQVTPDIFIFNLSIVDILLFLLGMPFL
CA1	-----MDFNNTNFS-----IDGNSST-AEDGALHC-----GAILPVIFGIICFLGIIGNCIVMYTIIMKTKCKRAKQVTPDIFIFNLSIVDILLFLLGMPFL
DR1b	-----MSTSGMRFRREIKPYSYQTTGDYQKRIVMDFMPTSEKSS-----NEFNSRHLDNDEHQV-----NVLMPISVGVICFVGIIGNCIIVTYIVKTKTKRAKQVTPDIFIFNLSIVDILLFLLGMPFL
DR1a	-----MDFPESESSSL-----RLSSSKSQIQVNTDDQYQ-----NAILPSIFGIICFLGICGNSIVVYTIIMKTKCKRAKQVTPDIFIFNLSIVDILLFLLGMPFL
Homo1	-----MTDFKLGIVRLGRVAG-KTKYTLIDEQ-----MSDFKLGIVRLGRVAG-KTKYTLIDEQ-----DIPLVESYSE-----DIPLVENYAFE
PA1	-----MSDFKLGIVRLGRVAG-KTKYTLIDEQ-----MSDFKLGIVRLGRVAG-KTKYTLIDEQ-----DIPLVESYSE-----DIPLVENYAFE

图 3 半滑舌鳎与其他物种的 MCHR 氨基酸序列比较

Fig.3 Comparison of the amino acid sequences of *C.semilaevis* MCHR and other species

“*”表示一致的氨基酸;“:”表示高度保守的氨基酸;“.”表示低保守的氨基酸;MCHR 氨基酸序列号见表 2; AS1、AS2: 扬子鳄; CA1、CA2: 鲫鱼; CS1、CS2: 半滑舌鳎; DR1a、DR1b、DR2: 斑马鱼; Gallus: 鸡; Homo1、Homo2: 人; LO1、LO2: 斑点雀鲷; NB1、NB2: 布氏新亮丽鲷; ON1、ON2: 尼罗罗非鱼; PA1、PA2: 美洲拟鲈; PR1、PR2: 网纹鲈; PO1、PO2: 牙鲆; TR1、TR2: 红鳍东方鲀; VM1、VM2: 条斑星鲷

Asterisks (*) indicated identical amino acid sequences; Dot (.) indicated highly conserved amino acid sequences; Dot (.) indicated amino acid sequences of low degree conserved; GenBank accession numbers were shown in Tab. 2; AS1, AS2: *A. sinensis*; CA1, CA2: *C. auratus*; CS1, CS2: *C. semilaevis*; DR1a, DR1b, DR2: *D. rerio*; Gallus: *G. gallus*; Homo1, Homo2: *H. sapiens*; LO1, LO2: *L. oculatus*; NB1, NB2: *N. brichardi*; ON1, ON2: *O. niloticus*; PA1, PA2: *P. americanus*; PR1, PR2: *P. reticulata*; PO1, PO2: *P. olivaceus*; TR1, TR2: *T. rubripes*; VM1, VM2: *V. moseri*

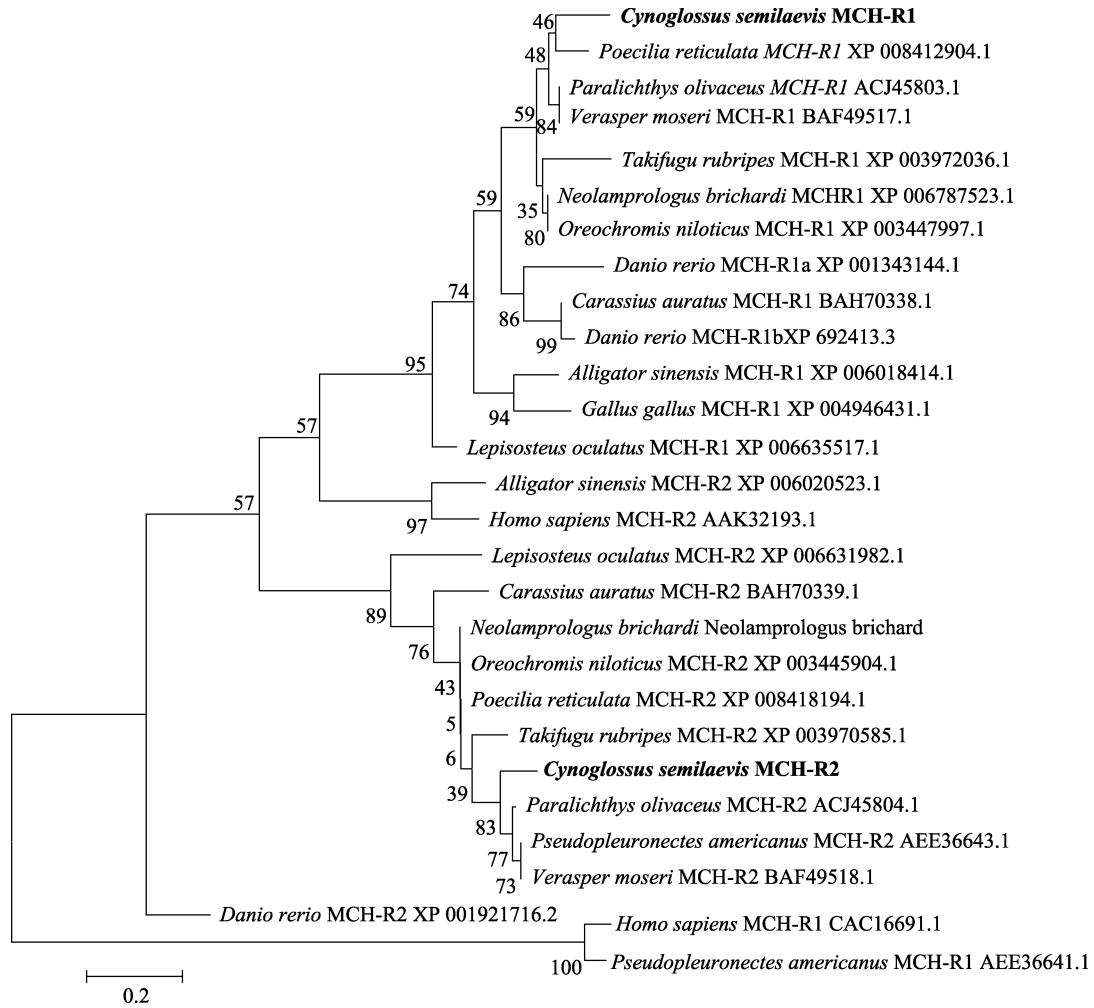


图 4 基于 MCHR 氨基酸序列的 NJ 系统进化树
 Fig.4 NJ phylogenetic tree based on MCHR amino acid sequences

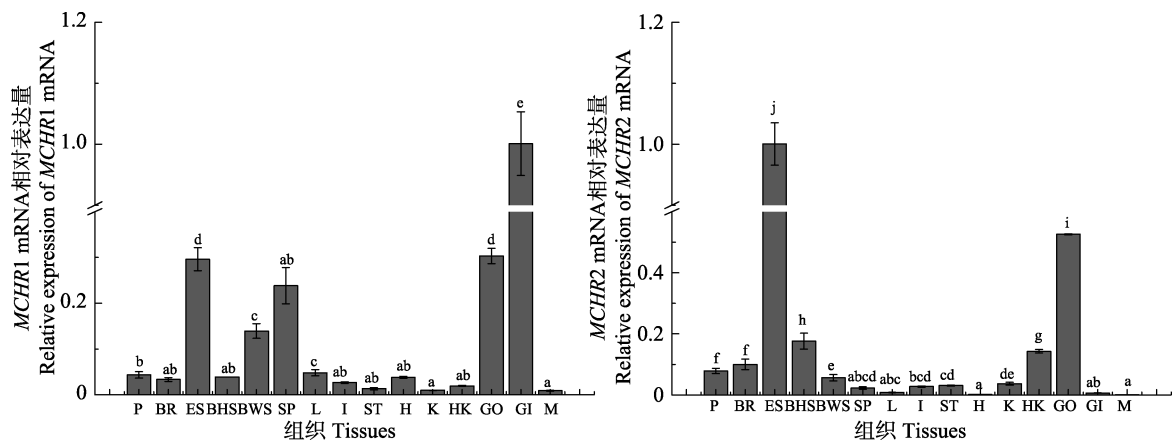


图 5 半滑舌鳎 MCHR mRNA 在不同组织中的相对表达量
 Fig.5 Relative expression of MCHR mRNA in different tissues of *C.semilaevis*

P: 垂体; BR: 脑; ES: 有眼侧皮肤; BHS: 无眼侧黑化皮肤; BWS: 无眼侧白皮肤; SP: 脾; L: 肝; I: 肠; ST: 胃; H: 心; K: 肾; HK: 头肾; GO: 性腺; GI: 鳃; M: 肌。不同字母代表差异显著($P<0.05$), 下同
 P: Pituitary; B: Brain; ES: Eye-side skin; BHS: Blind-side hypermelanosis skin; BWS: Blind-side white skin; SP: Spleen; L: Liver; I: Intestine; ST: Stomach; H: Heart; K: Kindey; HK: Head kidney; GO: Gonad; GI: Gill; M: Muscle. Different letters denoted significant differences ($P<0.05$), the same as below

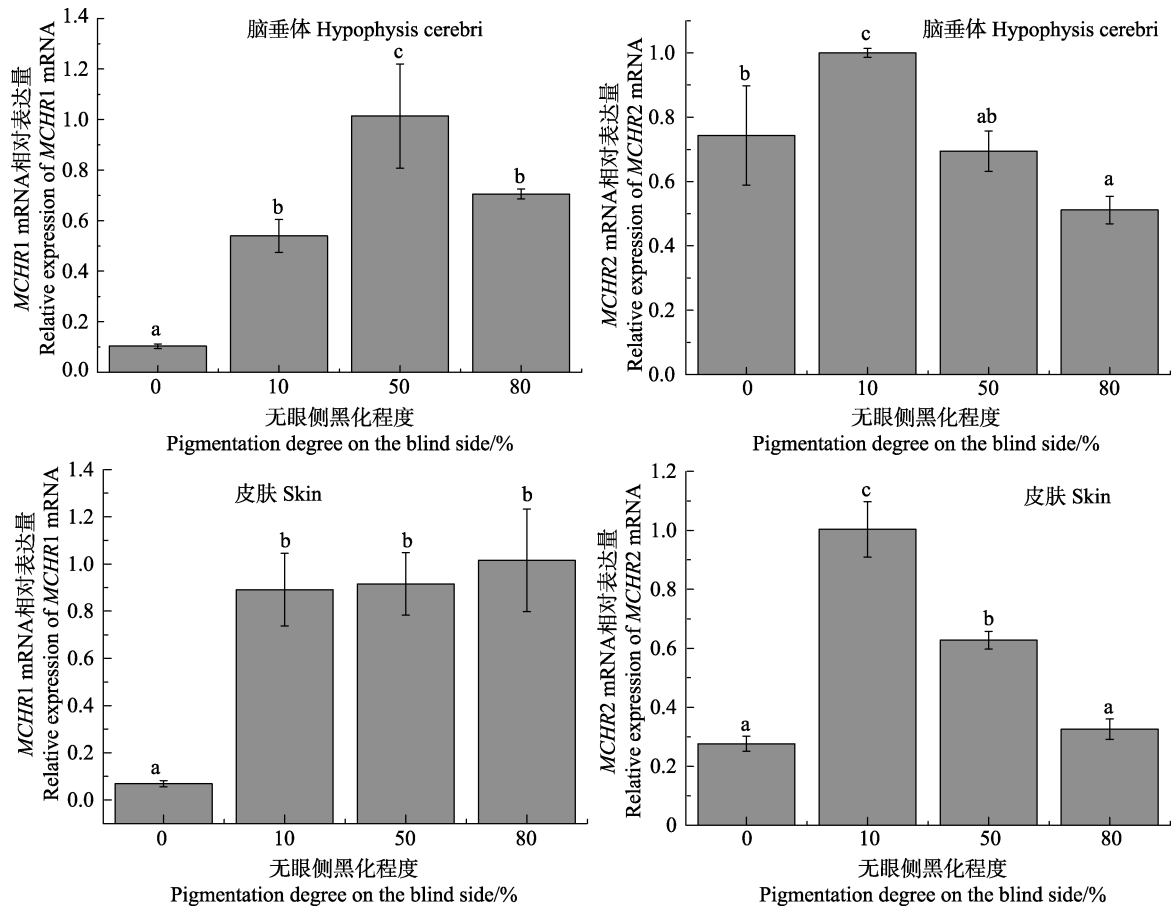


图 6 半滑舌鳎脑垂体和皮肤中 MCHR mRNA 的表达与无眼侧黑化程度的关系

Fig.6 Correlation between expression of MCHR mRNAs in hypophysis cerebri and skin of *C. semilaevis* and its pigmentation degree on the blind-side

2.6 MCHR 编码蛋白质三级结构预测

通过 SWISS-MODEL 网站预测了半滑舌鳎 MCHR 编码的蛋白质的三级结构,如图 7、图 8 所示。

3 讨论

本研究获得了半滑舌鳎 MCHR 的 2 个亚型 MCHR1 和 MCHR2 cDNA 序列全长,并研究了其组织表达特性和不同黑化面积表达特性,为进一步研究 MCH 对体色调控的作用信号途径提供了基础。本研究获得了半滑舌鳎 2 个 MCHR 亚型的结构,这种单个或多个亚型的现象可能是由早期基因组的复制或者在进化分离过程中丢失造成的。在基因结构方面,半滑舌鳎 MCHR1 编码 359 个氨基酸,含有 7 个糖基化位点,其中,3 个位于 N 端,1 个位于 C 端。美洲拟鳎 MCHR1 序列中没有发现糖基化位点(Tuziak *et al*, 2012),条斑星鳎中含有 5 个糖基化位点,其中 2 个 N 端糖基化位点(Takahashi *et al*, 2007)。MCHR2 编码 347 个氨基酸,含有 4 个 N 端糖基化位点和 7 个跨膜

结构域,这与条斑星鳎的 MCHR2 序列中糖基化位点数量与位置相同(Takahashi *et al*, 2007),而在美洲拟鳎 MCHR2 只发现 1 个糖基化位点、3 个跨膜结构域(Tuziak *et al*, 2012)。糖基化位点的存在可赋予蛋白质传导信号的功能,同时糖基化有助于某些蛋白的正确折叠,而跨膜结构对于受体蛋白发挥生物学功能起到决定性作用。不同鱼种间 MCHR 基因结构的差异可能与种的特异性和 MCHR1 功能的差异有关,具体机制还有待研究确认。同源性分析和系统进化分析表明,半滑舌鳎 MCHR1 和 MCHR2 的进化保守性较强,特别是 MCHR1。但 MCHR1 和 MCHR2 的氨基酸同源性仅为 30.1%,表明在进化过程中,其祖先基因发生了复制和功能分化,且这种分化发生的时期可能较早。

组织表达分析显示,半滑舌鳎 MCHR1 mRNA 主要在鳃、有眼侧皮肤、性腺、脾脏和无眼侧白皮中表达,这种广泛的表达特性与美洲拟鳎 MCHR1 的研究结果相似(Tunisia *et al*, 2012),而对条斑星鳎的研究发现, MCHR1 只在脑中表达(Takahashi *et al*, 2007),说明 MCHR1 的生理功能具有种属特异性。本研究还

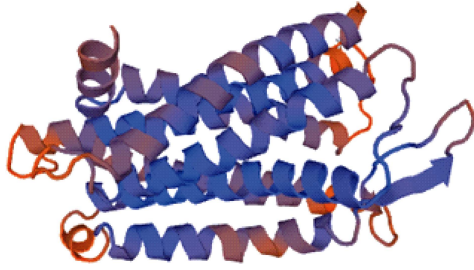


图7 SWISS-MODEL 预测的半滑舌鲷 MCHR1
蛋白三级结构

Fig.7 Tertiary structure of *C. semilaepis* MCHR1 protein predicted by SWISS-MODEL

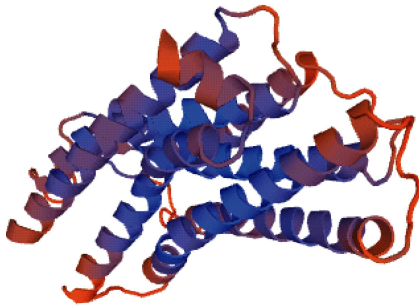


图8 SWISS-MODEL 预测的半滑舌鲷 MCHR2
蛋白三级结构

Fig.8 Tertiary structure of *C. semilaepis* MCHR2 protein predicted by SWISS-MODEL

发现, *MCHR2* mRNA 主要在有眼侧皮肤、性腺中表达,这与美洲拟鲈和条斑星鲈的研究结果一致。说明半滑舌鲷 *MCHR2* 可能具有与美洲拟鲈和条斑星鲈类似的生理功能,参与皮肤黑化和摄食行为的调控(Takahashi *et al*, 2007; Tuziak *et al*, 2012)。除主要靶器官外,在半滑舌鲷其他组织中也检测到 *MCHR* mRNA 的表达,这种表达模式在美洲拟鲈(Tuziak *et al*, 2012)、条斑星鲈(Takahashi *et al*, 2007)、斑马鱼(Berman *et al*, 2009)、金鱼(Mizusawa *et al*, 2009)等鱼类中也同样存在,暗示 *MCHR* 可能与其他硬骨鱼类一样具有多样化的生理功能。

本研究发现,半滑舌鲷有眼侧皮肤中 *MCHR* 的表达水平显著高于无眼侧黑化皮肤和无眼侧正常皮肤,表明皮肤中的 *MCHR* 直接参与了黑色素细胞的代谢调控过程。在 *MCH* 的研究中,我们发现半滑舌鲷 *MCH1* 和 *MCH2* 的主要靶器官为垂体,而本研究发现, *MCHR1* 和 *MCHR2* 的主要靶器官分别为鳃和有眼侧皮肤,提示 *MCHR* 介导 *MCH* 的生理功能可能是通过旁分泌和自分泌的信号途径。与无眼侧黑化皮肤和正常皮肤相比,有眼侧皮肤中 *MCH* 和 *MCHR* 的表达水平都显著升高。同时,在无眼侧黑化皮肤中的 *MCH1* 和 *MCHR1* 表达水平显著高于无眼侧正常皮

肤,而无眼侧黑化皮肤中 *MCH2* 和 *MCHR2* 表达水平显著低于无眼侧正常皮肤。由此说明, *MCH/MCHR* 信号系统在有眼侧体色调控和无眼侧黑化调控过程中可能存在协同作用,但具体的作用途径和机制尚需深入研究验证。

Takahashi 等(2004)在条斑星鲈 *MCHR* 的研究中发现, *MCH* 通过与 *MCHR* 结合控制着色素细胞中黑色素颗粒的聚合。条斑星鲈有眼侧皮肤中, *MCH* 通过与 *MCHR2* 特异结合调控体色以适应不同环境背景的变化,如白色养殖环境下有眼侧皮肤 *MCHR2* mRNA 表达量低于黑色养殖环境,表明 *MCHR2* 可能直接参与了对养殖环境的适应调控(Takahashi *et al*, 2007)。本研究初步揭示了 *MCHR* 与无眼侧黑化发生过程的关系,结合 *MCH* 的表达情况,发现在无眼侧黑化程度不同的半滑舌鲷垂体中, *MCH1* 和 *MCHR1* 具有互补表达的变化趋势,即无眼侧 10%黑化鱼垂体 *MCH1* 达峰值后显著下降,而 *MCHR1* 在 10%黑化鱼中表达开始升高,而在 50%黑化鱼中达峰值并在 80%黑化鱼中保持较高水平,这种互补表达特性提示了 *MCH* 与 *MCHR* 之间可能存在协同调控作用。皮肤中 *MCH1* 与 *MCHR1* 也存在类似的协同表达调控关系,其具体的信号通路尚需进一步研究。作者还发现,垂体和皮肤中的 *MCH1* 与 *MCHR2* 都分别存在类似的表达变化趋势, *MCH* 可能与 *MCHR1*、*MCHR2* 同时结合而发挥生理功能。有趣的是,我们发现半滑舌鲷垂体和皮肤中 *MCH2* 与 *MCHR1*、*MCHR2* 也具有类似的表达调控关系。综上所述, *MCH/MCHR* 系统对半滑舌鲷无眼侧黑化性状发生和发展的过程具有重要的调控作用,但 *MCH/MCHR* 结合作用途径及机制尚不明了。目前研究尚无法确定哪种因子是参与无眼侧黑化调控的关键因子,通过构建基因敲除型模式鱼类可能为基因的功能解析提供支撑,探明 *MCH/MCHR* 信号系统对无眼侧黑化的调控作用机制将有利于建立实用的体色调控技术。

参 考 文 献

- An S, Cutler G, Zhao JJ, *et al*. Identification and characterization of a melanin-concentrating hormone receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(13): 7576-7581
- Berman JR, Skariah G, Maro GS, *et al*. Characterization of two melanin-concentrating hormone genes in zebrafish reveals evolutionary and physiological links with the mammalian *MCH* system. Journal of Comparative Neurology, 2009, 517(5): 695-710

- Chambers J, Ames RS, Bergsma D, *et al.* Melanin-concentrating hormone is the cognate ligand for the orphan G-protein-coupled receptor SLC-1. *Nature*, 1999, 400(6741): 261–265
- Deng JY, Meng TX, Ren SM, *et al.* Composition and quantity distribution of the Bohai Sea fish species. *Marine Fisheries Research*, 1988, 9: 11–89 [邓景耀, 孟田湘, 任胜民, 等. 渤海鱼类种类组成及数量分布. *海洋水产研究*, 1988, 9: 11–89]
- Forray C. The MCH receptor family: Feeding brain disorders? *Current Opinion in Pharmacology*, 2003, 3(1): 85–89
- Griffond B, Baker BI. Cell and molecular cell biology of melanin concentrating hormone. *International Review of Cytology*, 2002, 213(4): 233–277
- Hill J, Duckworth M, Murdock P, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of MCH2, a novel human MCH receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(23): 20125–20129
- Jiang YW, Wang JR, Chen RS, *et al.* Artificial fry rearing of *Cynoglossus semilaevis* Günther in Bohai Sea. *Marine Fisheries Research*, 1993, 14: 25–33 [姜言伟, 万瑞景, 陈瑞盛, 等. 渤海半滑舌鳎人工育苗工艺技术的研究. *海洋水产研究*, 1993, 14: 25–33]
- Kang DY, Kim HC. Functional characterization of two melanin-concentrating hormone genes in the color camouflage, hypermelanosis, and appetite of starry flounder. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 189: 74–83
- Kawauchi H, Baker BI. Melanin-concentrating hormone signaling systems in fish. *Peptides*, 2004, 25(10): 1577–1584
- Kawauchi H, Kawazoe I, Tsubokawa M. Characterization of melanin concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature*, 1983, 305(5932): 321–323
- Kawauchi H. Functions of melanin-concentrating hormone in fish. *Journal of Experimental Zoology Part A Comparative Experimental Biology*, 2006, 305(9): 751–760
- Kishida M, Baker BI, Eberle AN. The measurement of melanin concentrating hormone in trout blood. *General and Comparative Endocrinology*, 1989, 74(2): 221–229
- Lakaye B, Minet A, Zorzi W, *et al.* Cloning of the rat brain cDNA encoding for the SLC-1 G protein-coupled receptor reveals the presence of an intron in the gene. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1401(2): 216–220
- Lembo PM, Grazzini E, Cao J, *et al.* The receptor for the orexigenic peptide melanin-concentrating hormone is a G-protein-coupled receptor. *Nature Cell Biology*, 1999, 1(5): 267–271
- Li ZJ, Yang LJ, Wang J, *et al.* β -Actin is a useful internal control for tissue-specific gene expression studies using quantitative real-time PCR in the half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* challenged with LPS or *Vibrio anguillarum*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 29(1): 89–93
- Liu XZ, Zhuang ZM. *Reproduction biology and culture technology of half-smooth tongue sole Cynoglossus semilaevis*. Beijing: China Agriculture Press, 2014, 1–10 [柳学周, 庄志猛. 半滑舌鳎繁育理论与养殖技术. 北京: 中国农业出版社, 2014, 1–10]
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- Logan DW, Bryson-Richardson RJ, Pagán KE, *et al.* The structure and evolution of the melanocortin and MCH receptors in fish and mammals. *Genomics*, 2003, 81(2): 184–191
- Mizusawa KL, Saito Y, Wang Z, *et al.* Molecular cloning and expression of two melanin-concentrating hormone receptors in goldfish. *Peptides*, 2009, 30(11): 1990–1996
- Mori M, Harada M, Terao Y, *et al.* Cloning of a novel G protein-coupled receptor, SLT, a subtype of the melanin-concentrating hormone receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 283(5): 1013–1018
- Pissios P, Maratos-Flier E. Melanin-concentrating hormone: From fish skin to skinny mammals. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2003, 14(5): 243–248
- Rodriguez M, Beauverger P, Naime I, *et al.* Cloning and molecular characterization of the novel human melanin-concentrating hormone receptor MCH2. *Molecular Pharmacology*, 2001, 60(4): 632–639
- Saito Y, Nothacker HP, Wang Z, *et al.* Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor. *Nature*, 1999, 400(6741): 265–269
- Suzuki M, Narnaware YK, Baker BI, *et al.* Influence of environmental colour and diurnal phase on MCH gene expression in the trout. *Journal of Neuroendocrinology*, 1995, 7(4): 319–328
- Takahashi A, Kobayashi Y, Amano M, *et al.* Structural and functional diversity of proopiomelanocortin in fish with special reference to barfin flounder. *Peptides*, 2009, 30(7): 1374–1382
- Takahashi A, Kosugi T, Kobayashi Y, *et al.* The melanin-concentrating hormone receptor 2 (MCH-R2) mediates the effect of MCH to control body color for background adaptation in the barfin flounder. *General and Comparative Endocrinology*, 2007, 151(2): 210–219
- Takahashi A, Tsuchiya K, Yamanome T, *et al.* Possible involvement of melanin concentrating hormone in food intake in a teleost fish, barfin flounder. *Peptides*, 2004, 25(10): 1613–1622
- Tan CP, Sano H, Iwaasa H, *et al.* Melanin-concentrating hormone receptor subtypes 1 and 2: Species-specific gene expression. *Genomics*, 2002, 79(6): 785–792
- Tuziak SM, Volkoff H. A preliminary investigation of the role of melanin-concentrating hormone (MCH) and its receptors in appetite regulation of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2012, 348(1): 281–296
- Wang S, Behan J, O'Neill K, *et al.* Identification and pharmacological characterization of a novel human melanin-concentrating hormone receptor, mch-r2. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(37): 34664–34670

Molecular Characterization of *MCHR* and Its Corelation with Blind-Side Hypermelanosis in *Cynoglossus semilaevis*

SHI Xueying^{1,3}, LIU Xuezhou^{1,2①}, SHI Ying⁴, XU Yongjiang^{1,2},
SHI Bao^{1,2}, WANG Bin^{1,2}, LI Bin^{1,3}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 4. Qingdao Extension Station of Fisheries Technology, Qingdao 266071)

Abstract The full-length cDNA of melanin concentration hormone receptor (*MCHR*) was isolated from the brain of *Cynoglossus semilaevis* using RACE (rapid amplification of cDNA ends) method. The spatial and temporal expression patterns of *MCHR* mRNA in different tissues were analyzed to link with the degree of pigmentation on the blind-side of fish by the quantitative real-time PCR. Results showed that *C. semilaevis* *MCHR1* cDNA sequence was 1685 bp in length and contained a 642 bp of open reading frame encoding 359 amino acids. It shared 83.3% identity with *Paralichthys olivaceus*. Based on the phylogenetic analysis, *C. semilaevis* *MCHR1* was clustered with the Pleuronectiformes, Cyprinodontiformes and Perciformes species. In addition, *C. semilaevis* *MCHR2* cDNA sequence was 1626 bp in length and contained a 1044 bp of open reading frame encoding 347 amino acids. The identity was more than 90% homology to pleuronectiformes species. *C. semilaevis* *MCHR2* was clustered with the pleuronectiformes and perciformes species based on the phylogenetic analysis. *MCHR1* mRNA was mainly expressed in gill and *MCHR2* mRNA was primarily expressed in the eye-side skin, followed by gonad. The spatial expression patterns of *MCHR* mRNA implied that *MCHR* regulates the physiology of *C. semilaevis* through endocrine, paracrine and autocrine pathways. Pituitary *MCHR1* mRNA level significantly increased during the initial stage of blind-side pigmentation and peaked when fish had 50% pigmentation on the blind-side. By comparison, skin *MCHR1* mRNA maintained at high levels during the pigmentation occurring on the blind-side of fish. Both pituitary and skin *MCHR2* mRNA levels peaked when fish had about 10% blind-side pigmentation, then significantly decreased as the degree of pigmentation reduced. The results showed that the *MCHR* is directly or indirectly involved in the regulation of blind-side hypermelanosis in half-smooth tongue sole.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; Melanin concentration hormone receptor; Gene cloning; Expression regulation; Hyperpigmentation on blind side

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

池塘养殖牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) 无眼侧体色黑化消褪机理*



朱学武^{1,3} 徐永江^{1,2} 柳学周^{1,2①} 史宝^{1,2} 王滨^{1,2}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与
食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 针对池塘养殖牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)无眼侧体色黑化消褪的现象,本研究从形态、血清和 mRNA 水平上对其生理学机制进行了研究。光镜观察显示,无眼侧消褪区域的黑色素细胞数量显著少于有眼侧和无眼侧黑化区域($P<0.05$),电镜观察发现,无眼侧消褪区域皮肤中黑色素颗粒模糊,黑色素细胞中色素体存在凋亡现象。无眼侧黑化区域消褪过程中,鳞片类型经历了由栉鳞—弱栉鳞—圆鳞转变的过程,栉鳞上硬棘数量也随之减少。无眼侧黑化消褪的牙鲆血清中的黑色素聚集激素(MCH)肽含量显著高于无眼侧正常和无眼侧黑化的牙鲆($P<0.05$),但无眼侧体色黑化的牙鲆血清中的黑色素细胞刺激激素(MSH)肽含量显著高于其他 2 种类型的牙鲆($P<0.05$)。基因表达分析显示,无眼侧黑化消褪鱼垂体 *MCH* mRNA 表达水平显著高于无眼侧黑化鱼($P<0.05$),而垂体 *POMC1* mRNA 表达水平显著低于无眼侧黑化鱼($P<0.05$),但都与无眼侧正常鱼无显著差异。研究结果可为阐释池塘养殖牙鲆无眼侧体色黑化调控机制提供理论支持。

关键词 牙鲆;无眼侧黑化消褪;色素细胞;黑色素聚集激素;黑色素细胞刺激激素;基因表达
中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0103-08

硬骨鱼类的体色是由体表皮肤和鳞片色素细胞的数量、类型以及分布区域决定的(Rawls *et al.*, 2001; 马爱军等, 2003; 史学营等, 2015)。在内源性调节机制方面,黑色素聚集激素(MCH)、黑色素细胞刺激激素(MSH)和去甲肾上腺素(NE)等多种激素参与调控色素细胞的迅速收缩和舒张进而起到调控体色的作用(van der Salm *et al.*, 2005; Fujii *et al.*, 1991; Fujii, 2000)。Oshima 等(2001)研究报道了不同剂量的 MCH 对鱼类色素细胞的影响,结果显示,低剂量的 MCH ($<1 \mu\text{mol/L}$)会引起黑色素细胞内色素体颗粒聚集,且当 MCH 存在时色素体颗粒会一直保持聚集状态。黑色素聚集激素基因(*MCH*)和阿黑皮素原基因(*POMC*)

是鲆鲽类体色调控的关键基因, *MCH* 的主要功能是参与抑制皮肤黑化调控过程,而 *POMC* 的主要功能是参与无眼侧黑化的诱发过程调控(Kang *et al.*, 2012, 2013)。

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是我国鲆鲽类三大主导养殖种类之一(欧俊新等, 2002; 木云雷等, 1999; 张美昭等, 1999)。养殖生产中发现,工厂化条件下养殖鱼出现高比例的无眼侧体色黑化现象,导致其市场价格较正常牙鲆低 20%以上,影响了养殖效益。近年来,作者在山东省日照市开展牙鲆池塘养殖实验时发现,无眼侧发生黑化的牙鲆在池塘养殖一段时间后,其无眼侧黑化程度表现为逐步消褪直至正常。针对此

* 国家鲆鲽类技术体系项目(CARS-50)资助 [This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-50)] 朱学武, E-mail: 478096318@qq.com

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-04-18, 收修改稿日期: 2016-05-23

现象,本研究从形态、血清和 mRNA 水平上对其生理机制进行了研究,旨在探讨池塘养殖牙鲆无眼侧体色黑化消退的机制,为建立养殖牙鲆无眼侧黑化调控技术提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料及取样

1.1.1 养殖条件 实验用牙鲆取自山东省日照市水利养殖场。2015年5月中旬前,在室内工厂化养殖车间进行实验鱼苗种中间培育。2015年5月中旬,实验鱼进入池塘进行养殖,养殖密度为4000尾/hm²,养殖期间水温为14–28℃,盐度为28–33,pH为7.8–8.2,溶解氧>5 mg/L。投喂鲜杂鱼,投喂量为养殖鱼体重的3%–5%,每日投喂2次。

1.1.2 无眼侧黑化及消退检测 入池塘养殖前,经检测,苗种的无眼侧黑化比例高达85%,未见无眼侧黑化消退的个体。池塘养殖过程中采集样品,每次取30尾实验鱼,检测无眼侧黑化情况,并计算无眼侧黑化、正常和消退个体的比例。无眼侧黑化消退的判断依据为无眼侧黑化区域黑化程度降低,逐渐转为淡黄色。

1.1.3 取样 2015年5月上旬,取样入塘前大规格苗种[体长为(18.0±3.3) cm、体重为(100.0±20.4) g] 10尾,分为无眼侧黑化、无眼侧正常两类样品。5月中旬,苗种进入池塘养殖,分别于2015年8月、11月再次取样。8月牙鲆体长为(30.0±5.1) cm、体重为(300.0±41.0) g、11月牙鲆体长为(40.0±5.5) cm、体重为(500.0±20.8) g,每次分别取无眼侧黑化、无眼侧正常和无眼侧黑化消退的实验鱼各3尾,用于体色相关基因表达检测。所有实验鱼样品以MS-222(300 mg/L)麻醉后,迅速取其垂体和脑组织,液氮速冻后–80℃保存,用于总RNA提取。11月取样时,对每种类型的牙鲆采取尾静脉取血方法抽取血液,置于灭菌的EP管中,3000 r/min离心10 min,取血清于–80℃保存,用于血清MCH和MSH表达水平测定。每次取样时,取实验鱼有眼侧、无眼侧正常、黑化区域和消退区域的鳞片与皮肤,鳞片用于色素细胞及鳞片形态观察,皮肤用于电镜观察,具体操作方法参照商晓梅等(2016)。

1.2 RNA提取和cDNA第1链的合成

利用RNAiso Plus (TaKaRa, 日本)提取垂体和脑组织总RNA,通过1%琼脂糖凝胶电泳检测质量,使用微量核酸测定仪(Nanodrop ND2000)检测浓度。利用

PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis 试剂盒(TaKaRa, 日本)反转录合成cDNA第1链,按试剂盒说明操作。

1.3 色素细胞形态与数量分布特征分析

取有眼侧、无眼侧黑化、无眼侧正常和无眼侧消退部位的鳞片,制作临时装片,将鳞片置于生理盐水(0.85%)中伸展3–5 min,吸水纸吸干后,用中性树脂将其固定。用正立显微镜(NIKON 80i)对色素细胞进行观察、测量和记录,并用CCD数码智能型成像系统进行拍照。

每个部位制作3–5张装片,记录每个视野下黑色素细胞的数量,每个样本观察30个视野进行统计分析,实验数据表示为平均值±标准差(Mean±SD)。同时,观察鳞片形态特征,记录鳞片类型、硬棘数量,分析其与无眼侧黑化的关系。

1.4 激素水平检测

以鱼源MCH ELISA测定试剂盒、鱼源MSH ELISA测定试剂盒(北京绿源博德)检测血清中MCH、MSH肽浓度。试剂盒的最低检测浓度小于0.1 ng/ml;不与其他可溶性结构类似物交叉反应;板内、板间变异系数均小于15%。MCH和MSH标准品线性回归与预期浓度相关系数 r^2 值分别为0.9985和0.9994。

1.5 荧光实时定量PCR分析

根据NCBI登录的牙鲆POMC-1 (GenBank: AF184066.1)和POMC-2 (GenBank: AF191593.1)、MCH (GenBank: EU232720.1)的cDNA序列分别设计定量引物,以18S为内参设计定量引物18S-DF和18S-DR,荧光实时定量PCR所用各引物序列见表1。

使用SYBR Premix Ex TaqTM II (TaKaRa, 日本)试剂盒配制反应体系,20 μl PCR体系:cDNA模板2 μl,10 μmol/L的上、下游引物各0.8 μl,SYBR Premix Ex TaqTM II 10 μl和ddH₂O 6.4 μl。采用两步法,PCR反应条件:95℃预变性30 s,95℃ 5 s,60℃ 20 s,共40个循环。在Mastercycler ep realplex real-time PCR仪(Eppendorf)上运行。

定量PCR扩增根据标准曲线的相关系数(r^2)和扩增效率(E)确定反应条件。实时定量标准曲线以垂体cDNA进行5倍梯度稀释成6个标准品进行制作。所有基因的标准曲线 $0.99 < r^2 < 0.999$, $0.85 < E < 1.1$ 。

每次实验3个重复,每个组织样品进行3次平行实验,PCR反应完成后观察熔融曲线以确定扩增特异性,每次实验均设置空白对照。以18S为内参,利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目的基因的相对表达量(Livak *et al.*, 2001)。

表 1 牙鲆体色相关基因定量检测所用引物序列
Tab.1 Primer sequences for qPCR detection of body color related genes of *P. olivaceus*

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'-3')	作用 Function
MCH-F	AACAGCGACACAAGCTCTCC	MCH Real-time PCR
MCH-R	GCGAAGATGATGGACATGAA	
POMC-1-F	GCGGAGTAATGTGTCCTGTG	POMC-1 Real-time PCR
POMC-1-R	CATGCTGCTCTCATCCTTCA	
POMC-2-F	GGCCGCTACTCACACTCTC	POMC-2 Real-time PCR
POMC-2-R	TCTCTCGGCTCATCTTCCAT	
PACAP-F	ATGTCTAGCAAAGCGACCTTAGC	PACAP Real-time PCR
PACAP-R	GAGGATGCTACAAATATGCCAG	
18S-DF	ATGGCCGTTCTTAGTTCTCTG	18S Real-time PCR
18S-DR	CCACGCTGATCCAGTCAGT	

1.6 数据统计分析

实验数据采用 SPSS 17.0 统计,对色素细胞数量、硬棘数量、激素表达水平和基因的表达水平分别进行单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 牙鲆无眼侧体色黑化消退的表观特征

本研究观察了无眼侧黑化牙鲆在池塘养殖过程中黑化消退的情况,发现其无眼侧黑化部位皮肤颜色由黑色-淡黄色-白色-正常体色(图 1)。同时发现,

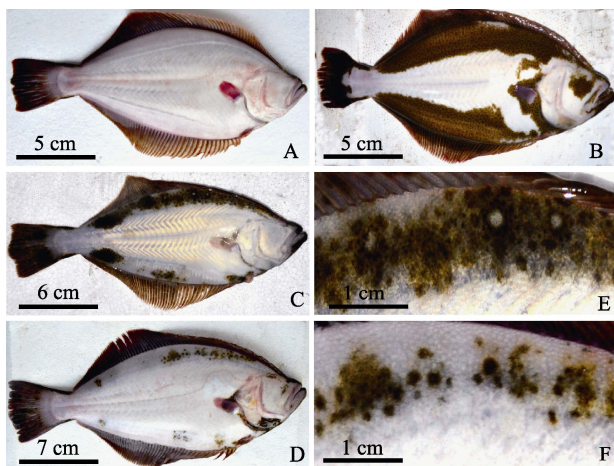


图 1 牙鲆无眼侧黑化消退的表观特征

Fig.1 The morphology of degeneration of *P. olivaceus* blind-side hypermelanosis

A: 无眼侧正常; B: 无眼侧黑化; C: 无眼侧黑化部分消退; D: 无眼侧黑化消退; E、F 分别为 C、D 的局部放大

A: Normal blind-side; B: Blind-side hypermelanosis; C: Blind-side partial degeneration; D: Blind-side degeneration; E, F were partial magnification of figure C and D respectively

养殖过程中无眼侧黑化消退的牙鲆比例不断增加,待 11 月取样结束、商品鱼出池销售时,随机检测 100 尾养殖牙鲆,无眼侧全部正常的个体占 67% (图 1-A),无眼侧黑化个体比例仅为 4% (图 1-B-图 1-D),无眼侧有少许黑色斑点的个体占 29% (图 1-E、图 1-F),表明池塘养殖牙鲆无眼侧黑化特征消退明显。

2.2 黑色素细胞形态与分布特征

2.2.1 黑色素细胞形态特征比较 无眼侧黑化消退的牙鲆不同部位的鳞片黑色素细胞形态存在明显不同(图 2)。有眼侧鳞片上的黑色素细胞形态清晰、呈现明显的树枝状或鸟粪状(图 2-A),无眼侧黑化区

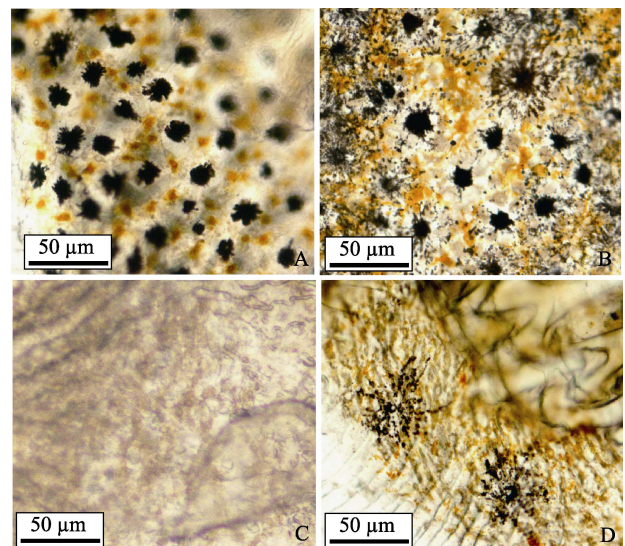


图 2 光镜下牙鲆鳞片黑色素细胞形态及分布

Fig.2 Morphology and distribution of melanophores of *P. olivaceus* scales under light microscope

A: 有眼侧; B: 无眼侧黑化区域; C: 无眼侧正常区域; D: 无眼侧黑化消退区域

A: Eye-side; B: Blind-side scale with hypermelanosis; C: Normal blind-side; D: Degenerated blind-side

域黑色素细胞形态同有眼侧区域(图 2-B)。无眼侧正常区域无黑色素细胞分布(图 2-C), 而无眼侧黑化消退区域黑色素细胞分布较为稀疏, 细胞体积大而弥散, 呈现出较为典型的凋亡特征(图 2-D)。

2.2.2 黑色素细胞数量特征 统计实验鱼有眼侧、无眼侧正常、无眼侧黑化区域和无眼侧黑化消退区域的黑色素细胞分布数量(表 2)。不同部位鳞片上的黑色素细胞数量存在很大差异, 有眼侧鳞片的黑色素细胞数量显著多于其他部位的黑色素细胞数量($P<0.05$), 依次为有眼侧 > 无眼侧黑化区域 > 无眼侧黑化消退区域 > 无眼侧正常区域。消退区域的黑色素细胞数量显著少于有眼侧和黑化区域($P<0.05$)。

表 2 牙鲆不同部位黑色素细胞数量统计($n=30$)

Tab.2 The number of melanophores at different parts of *P. olivaceus* ($n=30$)

牙鲆不同部位 Different parts of <i>P. olivaceus</i>	黑色素细胞 Melanophores (cells/0.1 mm ²)
有眼侧 Eye side	36.6±5.2 ^a
无眼侧黑化区域 Blind-side hypermelanosis part	20.5±3.6 ^b
无眼侧黑化消退区域 Blind-side hypermelanosis degeneration part	5.6±2.3 ^c
无眼侧正常区域 Normal part on blind side	0

注: 不同字母表示差异显著($P<0.05$)。下同

Note: Data with different letters were significantly different ($P<0.05$). The same as below

2.2.3 黑色素细胞的电镜观察 对无眼侧黑化区域和无眼侧黑化消退区域的皮肤进行电镜观察(图 3)。无眼侧黑化区域皮肤中的黑色素细胞明显, 细胞内的黑色素颗粒清晰且均匀分布(图 3-A、图 3-B)。在无眼侧黑化消退区域皮肤中也存在少量黑色素细胞, 其中黑色素颗粒模糊不清, 表现出较为明显的凋亡迹象(图 3-C、图 3-D)。

2.3 鳞片形态特征分析

2.3.1 鳞片的类型 本研究发现, 牙鲆有眼侧、无眼侧黑化和正常区域的鳞片类型不同(图 4)。有眼侧鳞片为栉鳞(图 4-A); 无眼侧黑化区域鳞片为弱栉鳞(图 4-B); 无眼侧正常区域鳞片为圆鳞(图 4-C); 无眼侧黑化消退区域的鳞片类型介于弱栉鳞与圆鳞之间(图 4-D), 其可能是黑化区域鳞片类型向圆鳞转化的过渡形态。

2.3.2 栉鳞上硬棘的数量特征 对牙鲆有眼侧、无眼侧黑化和黑化消退区域的栉鳞上硬棘数量进行了

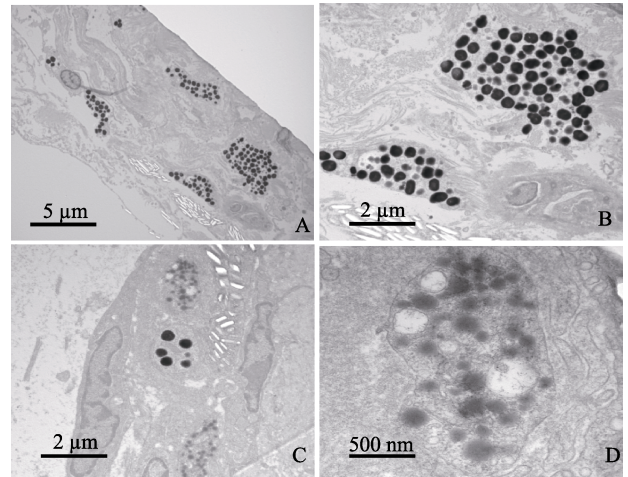


图 3 电镜下牙鲆皮肤黑色素细胞颗粒形态及分布
Fig.3 Morphology and distribution of melanophores of *P. olivaceus* under electron microscope

A. 无眼侧黑化区域($\times 5000$); B. 无眼侧黑化区域($\times 12000$); C. 无眼侧黑化消退区域($\times 12000$); D. 无眼侧黑化消退区域($\times 60000$)

A. Blind-side skin with hypermelanosis ($\times 5000$); B. Blind-side skin with hypermelanosis ($\times 12000$); C. Blind-side skin from degeneration regions ($\times 12000$); D. Blind-side skin from degeneration regions ($\times 60000$)

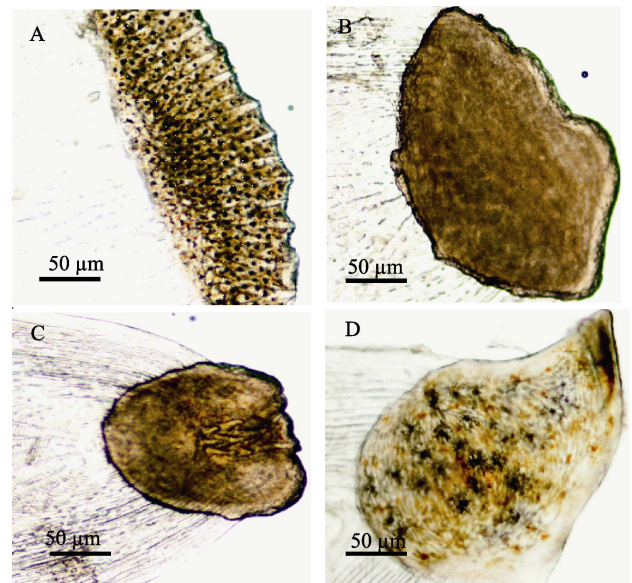


图 4 无眼侧黑化牙鲆不同类型的鳞片形态特征
Fig.4 Morphology of different types of scales of *P. olivaceus* with blind-side hypermelanosis

A: 有眼侧鳞片; B: 无眼侧正常区域圆鳞; C: 无眼侧黑化区域鳞片; D: 无眼侧黑化消退区域鳞片
A: Scale from eye side; B: Circular scale from normal part of blind side; C: Scale from blind-side part with hypermelanosis. D: Scale from blind-side part with degeneration

统计分析(表 3)。栉鳞上的硬棘多成 2 排或 3 排排列,

有眼侧栉鳞上的硬棘数量明显多于无眼侧, 无眼侧黑化区域栉鳞上的硬棘数量多于黑化消退区域。

表 3 无眼侧黑化牙鲈不同部位栉鳞上硬棘数量
Tab.3 The number of spines on the ctenoid scale at different parts of *P. olivaceus* with blind-side hypermelanosis

牙鲈不同部位 Different parts of <i>P. olivaceus</i>	硬棘数量(平均值±标准差) Number of spines (Mean±SD)
有眼侧 Eye side	24±1.58 ^a
无眼侧黑化区域 Blind-side hypermelanosis part	9.6±1.4 ^b
无眼侧消退区域 Blind-side hypermelanosis degeneration part	3.5±0.98 ^c

2.4 血清 MCH 和 MSH 表达水平差异

无眼侧黑化消退的牙鲈血清 MCH 的含量显著高

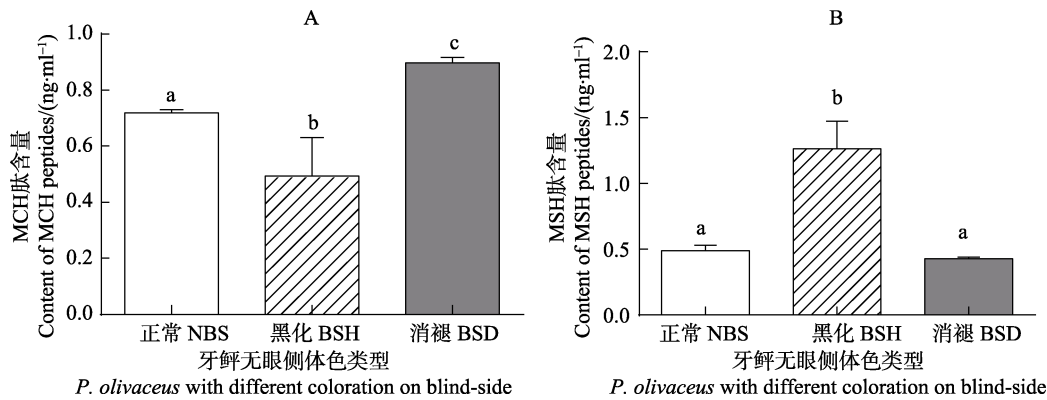


图 5 3 种无眼侧体色不同的牙鲈血清 MCH 和 MSH 肽含量

Fig.5 The MCH and MSH peptide contents of three types of *P. olivaceus* with different color on blind-side

NBS: 无眼侧正常牙鲈; BSH: 无眼侧黑化牙鲈; BSD: 无眼侧黑化消退牙鲈;

数据标有相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$), 标有不同字母则表示差异显著 ($P<0.05$), 下同

NBS: Normal blind-side fish; BSH: Blind-side hypermelanosis type; BSD: Blind-side degeneration type; Data with the same letter were not significantly different ($P>0.05$), while with different letters were significantly different ($P<0.05$), the same as below

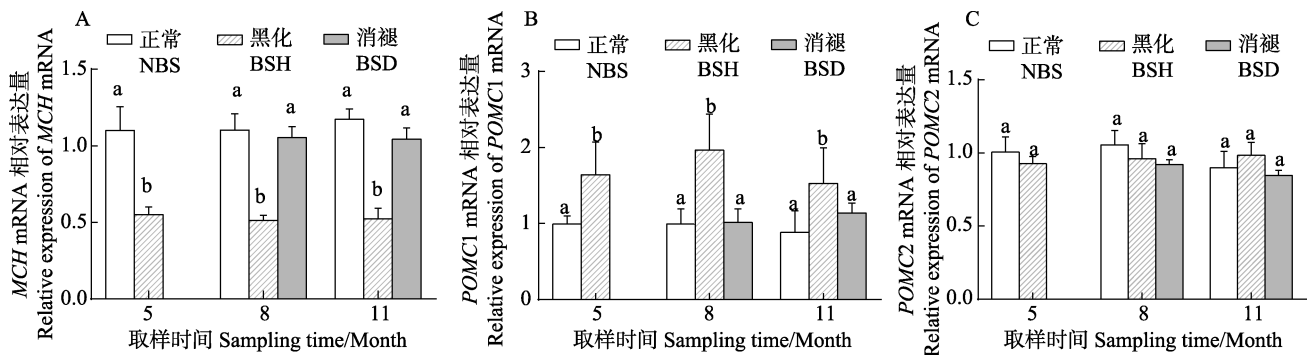


图 6 牙鲈垂体中体色相关基因 *MCH1* (A)、*POMC1* (B)、*POMC2* (C) mRNA 表达水平
Fig.6 The *MCH1* (A), *POMC1* (B), *POMC2* (C) mRNA levels in the pituitary of *P. olivaceus*

于其他 2 种类型 ($P<0.05$), 无眼侧黑化的牙鲈血清中 MCH 肽的含量最低 ($P<0.05$) (图 5-A)。同时, 无眼侧黑化的牙鲈血清 MSH 的含量最高 ($P<0.05$), 无眼侧正常和黑化消退的牙鲈血清 MSH 肽的含量无显著差异 ($P>0.05$) (图 5-B)。

2.5 基因表达特征

比较了 3 个取样阶段牙鲈 (无眼侧黑化程度不同) 垂体中体色相关基因表达水平, 结果显示: 不同的取样阶段, 无眼侧正常鱼和无眼侧黑化消退鱼的垂体 *MCH* mRNA 表达水平明显高于无眼侧黑化鱼 ($P<0.05$), 而无眼侧黑化鱼的垂体 *POMC1* mRNA 表达水平明显高于其他 2 种。各个阶段牙鲈垂体 *POMC2* mRNA 表达水平无显著差异 ($P>0.05$)。

3 讨论

本研究观察了池塘养殖牙鲈无眼侧黑化特征消

褪的现象,并从形态学、血清学和基因水平探讨了其可能的机制,为鲟鳇类无眼侧体色黑化调控机制研究提供了新的佐证和资料。

3.1 色素细胞和鳞片数量形态特征

鱼类能够通过调节色素细胞数量分布以及胞内色素体的聚集和分散来改变调节体色(van der Salm *et al*, 2005)。叶元土等(2006)认为,出现分支不明显的黑色素细胞是细胞老化的表现,细胞衰老从而使黑色素细胞分支逐渐减少或消失,细胞进而萎缩、凋亡。本研究发现,牙鲟无眼侧黑化消退区域的黑色素细胞数量较少,分支及形态模糊,发生了细胞凋亡,表明无眼侧黑化消退过程伴随着黑色素细胞的形态及其内源性调控机制的变化。Isojima 等(2013)对牙鲟无眼侧黑化机制的研究表明,无眼侧正常区域覆盖圆鳞,黑化区域的鳞片为栉鳞,而它们的交界区域多为弱栉鳞,黑色素细胞的转移与鳞片的类型存在着密切的关系。这与本研究结果一致,同时还发现,无眼侧黑化消退区域的鳞片类型介于弱栉鳞与圆鳞之间,表明牙鲟无眼侧黑化区域消退的过程中,鳞片类型也随之发生转变。此外,有眼侧、无眼侧黑化和消退区域的栉鳞上硬棘数量存在较大差异,特别是无眼侧黑化消退区域,随着黑化程度的减弱,栉鳞上硬棘数量减少。综上所述,无眼侧的黑化发生过程以及黑化消退过程都与鳞片的发生和发育调控系统密切相关。阐明牙鲟鳞片发生和发育的调控机制,将有助于阐释池塘养殖牙鲟无眼侧黑化发生和消退的具体机制。

3.2 MCH 和 MSH 差异表达关系

Fredriksson 等(2003)和 Kang 等(2012)研究表明,垂体分泌的 MCH 和 MSH 肽,是一对具有拮抗生理功能的神经肽,前者能够引起黑色素细胞内色素体聚集,从而诱发体色变淡,后者则使黑色素细胞内色素体分散分布,从而诱发黑化。本研究发现,无眼侧黑化消退的牙鲟血清中 MCH 肽的含量显著高于无眼侧黑化和正常个体,表明无眼侧黑化消退过程中 MCH 可能起到了正向调控作用,其表达启动的外在和内源性因子及作用机制有待揭示。同时还发现,无眼侧皮肤黑化的牙鲟中 MSH 肽的含量显著高于其他 2 种牙鲟,而无眼侧体色正常和黑化消退的牙鲟中 MSH 肽的含量基本一致,表明 MSH 肽高表达主要与无眼侧黑化过程相关,这与其他鳃形目鱼类的研究结果一致(Berman *et al*, 2009)。

3.3 体色相关表达基因表达

对星斑川鲟(*Platichthys stellatus*)和条斑星鲟

(*Verasper moseri*)的研究表明, MCH 具有抑制无眼侧黑化发生的调控作用(Takahashi *et al*, 2007; Yamanome *et al*, 2007)。本研究发现,无眼侧黑化消退的牙鲟垂体 MCH mRNA 表达水平显著高于无眼侧黑化个体,同时与无眼侧正常个体无显著差异,与血清 MCH 肽的表达作用相一致,表明 MCH 及其基因均参与了无眼侧黑化消退的调控过程,其间存在密切的协同作用效应。MCH 是通过结合并激活其受体(MCHR)从而对动物体色进行调控(Civelli *et al*, 2008; Wang *et al*, 2001),脊椎动物有 2 种不同等位形式的受体 MCHR1 和 MCHR2,本研究中 MCH 与哪种受体特异性结合而行使生理功能还需深入探讨。POMC 能够诱发养殖牙鲟无眼侧黑化发生,牙鲟 POMC 也存在 2 种不同等位形式的基因 POMC1 和 POMC2 (Kobayashi *et al*, 2009)。本研究发现,无眼侧黑化消退的牙鲟垂体 POMC1 mRNA 表达水平显著低于无眼侧黑化个体,同时与无眼侧正常个体无显著差异,表明 POMC1 参与了无眼侧黑化消退过程的调控,但其可能扮演了反向调控因子的角色。本研究还发现,在 3 个养殖阶段中,牙鲟垂体 POMC2 mRNA 表达水平都无显著差异,表明了其可能不参与无眼侧黑化消退过程的调控。有关牙鲟 POMC 两个等位基因在无眼侧黑化消退调控过程中的信号通路有待深入研究。

与工厂化养殖相比,池塘养殖水环境、底泥以及养殖牙鲟肠道菌群结构多样性较高(李存玉等, 2015)。本研究发现,仅在泥沙底质的池塘养殖条件下,牙鲟会发生无眼侧黑化的消退,工厂化养殖条件下养殖鱼不会发生此种现象。此外,在调研河北、天津等地池塘与工厂化养殖条件下牙鲟无眼侧黑化情况时也发现,即使同在池塘养殖条件下,水体透明度高的池塘养殖牙鲟无眼侧黑化的问题依然较为严重。由此,作者推测,池塘养殖牙鲟无眼侧黑化的消退现象可能与水体透明度低、池塘环境菌群丰度和多样性高、肠道菌群调节有关。

参 考 文 献

- Berman JR, Skariah G, Maro GS, *et al*. Characterization of two melanin-concentrating hormone genes in zebrafish reveals evolutionary and physiological links with the mammalian MCH system. *Journal of Comparative Neurology*, 2009, 517 (5): 695-710
- Civelli O, Zhou QY. Orphanprotein-coupled receptors and novel neuropeptide. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 2008, 46: 251-256
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, *et al*. The G- protein coupled receptors in the human genome form five main

- families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular Pharmacology*, 2003, 63(6): 1256–1272
- Fujii R, Hayashi H, Toyohara J, *et al.* Analysis of the reflection of light from the motile iridophores of the dark sleeper, *Odontobutis obscura obscura*. *Zoological Science*, 1991, 8(3): 461–470
- Fujii R. The regulation of motile activity in fish chromatophores. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 2000, 13(5): 300–319
- Isojima T, Tsuji H, Masuda R, *et al.* Formation process of staining-type hypermelanosis in Japanese flounder juveniles revealed by examination of chromatophores and scales. *Fisheries Science*, 2013, 79(2): 231–242
- Kang DY, Kim HC. Functional characterization of two melanin-concentrating hormone genes in the color camouflage, hypermelanosis, and appetite of starry flounder. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 189: 74–83
- Kang DY, Kim HC. Relevance of environmental factors and physiological pigment hormones to blind-side hypermelanosis in the cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 2012, 356–357: 14–21
- Kobayashi Y, Mizusawa K, Yamanome T, *et al.* Possible paracrine function of α -melanocyte-stimulating hormone and inhibition of its melanin-dispersing activity by N-terminal acetylation in the skin of the barfin flounder (*Verasper moseri*). *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 161(3): 419–424
- Li CY, Xu YJ, Liu XZ, *et al.* Comparative analysis of composition, diversity and origin of intestinal bacterial community in pond-and indoor tank-culture Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(2): 245–255 [李存玉, 徐永江, 柳学周, 等. 池塘和工厂化养殖牙鲈肠道菌群结构的比较分析. *水产学报*, 2015, 39(2): 245–255]
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- Ma AJ, Lei JL, Chen SQ, *et al.* Progress of research on albinism mechanisms of flatfish. *Marine Fisheries Research*, 2003, 24(3): 80–85 [马爱军, 雷霆霖, 陈四清, 等. 鲆鲽类白化机理的研究进展. *海洋水产研究*, 2003, 24(3): 80–85]
- Mu YL, Liu Y, Wang J, *et al.* Study on indoor culture of flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fisheries Science*, 1999, 18(3): 3–8 [木云雷, 刘悦, 王鉴, 等. 牙鲈室内人工养殖试验. *水产科学*, 1999, 18(3): 3–8]
- Oshima N, Nakamaru N, Araki S, *et al.* Comparative analysis of the pigment-aggregating and -dispersing actions of MCH on fish chromatophores. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology and Pharmacology*, 2001, 129(2): 75–84
- Ou JX, Lin XZ. Flounder culture test in Fujian coastal pool. *Marine Sciences*, 2002, 26(8): 20–22 [欧俊新, 林祥志. 福建沿海牙鲈池塘养殖试验. *海洋科学*, 2002, 26(8): 20–22]
- Rawls JF, Mellgren EM, Johnson SL. How the zebrafish gets its stripes. *Developmental Biology*, 2001, 240(2): 301–314
- Shang XM, Ma AJ, Wang XA, *et al.* Morphological characteristics and functional investigation of the abocular side skins on head of six pleuronectiformes fishes. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(2): 189–197 [商晓梅, 马爱军, 王新安, 等. 六种鲆形目鱼类无眼侧头部皮肤形态特征与功能探讨. *水产学报*, 2016, 40(2): 189–197]
- Shi XY, Xu YJ, Wu NN, *et al.* Preliminary studies on blind-side hypermelanosis of *Cynoglossus semilaevis*: Chromatophores observation and expression of proopiomelanocortin. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(2): 45–54 [史学营, 徐永江, 武宁宁, 等. 半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) 体表色素细胞观察及 POMC 表达特性分析. *渔业科学进展*, 2015, 36(2): 46–53]
- Takahashi A, Kosugi T, Kobayashi Y, *et al.* The melanin-concentrating hormone receptor 2 (MCH-R2) mediates the effect of MCH to control body color for background adaptation in the barfin flounder. *General and Comparative Endocrinology*, 2007, 151(2): 210–219
- van der Salm A, Spanings T, Gresnigt R, *et al.* Background adaptation and water acidification affect pigmentation and stress physiology of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 144(1): 51–59
- Wang S, Behan J, O'Neill K, *et al.* Identification and pharmacological characterization of a novel human melanin-concentrating hormone receptor (mch-r2). *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(37): 34664–34670
- Yamanome T, Amano M, Amiya N, *et al.* Hypermelanosis on the blind side of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* is diminished by rearing in a white tank. *Fisheries Science*, 2007, 73(2): 466–468
- Ye YT, Guo JL, Xiao PZ, *et al.* Observation of the body color and scale melanophores of cultured Wuchang Fish. *Feed Industry*, 2006, 27(22): 25–27 [叶元土, 郭建林, 萧培珍, 等. 养殖武昌鱼体色与鳞片黑色素细胞的观察. *饲料工业*, 2006, 27(22): 25–27]
- Zhang MZ, Zhang ZQ, Zheng CB, *et al.* Energy metabolism of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1999, 6(1): 75–79 [张美昭, 张兆琪, 郑春波, 等. 牙鲈幼鱼能量代谢的初步研究. *中国水产科学*, 1999, 6(1): 75–79]

Physiological Mechanisms for Degeneration of Blind-Side Hypermelanosis in Pond-Cultured Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)

ZHU Xuewu^{1,3}, XU Yongjiang^{1,2}, LIU Xuezhou^{1,2①}, SHI Bao^{1,2}, WANG Bin^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Blind-side hypermelanosis is a serious problem among intensively cultured *Paralichthys olivaceus*, resulting in significant economic losses. To date, no treatment is available to prevent this problem due to lack of knowledge. However, the degeneration of blind-side hypermelanosis was observed among pond-cultured *P. olivaceus* recently. To investigate the possible mechanisms, three types of *P. olivaceus* were identified based on the pigmentation on the blind side: normal blind-side type (NBS), blind-side hypermelanosis type (BSH), and blind-side degeneration type (BSD), and used for the comparison of morphological and associated endocrine changes at hormonal and mRNA levels. For BSD type, the number of melanocytes in the hypermelanosis-degenerated parts of blind side was reduced significantly comparing to those in the eye-side parts and in the blind-side parts in the BSD type. Moreover, the scales in the hypermelanosis-degenerated parts experienced the transformation from ctenoid to weak ctenoid, and cycloid shape. Meanwhile, the number of ctenoid scale spines on the blind-side decreased in hypermelanosis-degenerated parts among BSD fish. The plasma melanocyte-stimulating hormone (MSH) and melanin-concentrating hormone (MCH) levels were determined and compared between the three types of *P. olivaceus*. Our results showed that the BSD plasma MCH level was significantly higher than that of NBS and BSH, whereas the BSH had the highest MSH level among all three types of fish. Gene expression analysis showed that the BSD pituitary MCH mRNA level was remarkably higher than that of BSH, but for POMC mRNA level, the BSD was significantly low. Results from the present study significantly improved the understanding of the hyperpigmentation on the blind-side of *P. olivaceus* and help to develop the protocol to control this problem in aquaculture production.

Key words *Paralichthys olivaceus*; Blind-side hypermelanosis degeneration; Melanocytes; MCH; MSH; Gene expression

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)仔稚幼鱼肠道 菌群结构比较分析*



刘增新^{1,2} 柳学周^{1,2①} 史宝¹ 徐永江¹ 刘权^{1,2}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 采用 MiSeq 16S rRNA 高通量测序技术和生物信息学分析方法, 构建了牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)工厂化人工育苗模式下仔稚幼鱼阶段 6 个不同发育时期 18 个样品的 16S rRNA 基因测序文库, 共获得 7462 个 OTU (Operational Taxonomic Unit), 分类为 42 个菌门 972 个菌属。对肠道菌群的形成过程及结构多样性变化分析显示, 牙鲆初孵仔鱼的菌群组成多样性丰富, 体内的优势菌为变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes); 在 9 日龄和 21 日龄摄食轮虫(*Rotifer*)和卤虫(*Artemia* sp.)幼体样品中, 肠道的优势菌群结构较单一, 变形菌门成为此时期肠道的优势菌群; 45 日龄摄食配合饲料后, 肠道中变形菌门的相对丰度显著降低, 厚壁菌门和拟杆菌门的相对丰度明显增大, 成为肠道菌群的优势菌群。在属水平的菌群结构中发现, 牙鲆仔稚幼鱼肠道优势菌群的种类和数量都发生了较大变化, 在 9 日龄和 21 日龄时期肠道中弧菌属(*Vibrio*)相对丰度最高, 到 45 日龄后相对丰度锐减到最低水平; 拟杆菌属(*Bacteroides*)和普氏菌属(*Prevotella*)在 80 日龄后达到较高水平, 成为肠道优势菌属; 厚壁菌门的 8 个菌属在 80–115 日龄时期均发展成为优势菌属, 定植于牙鲆的肠道。本研究揭示了工厂化人工育苗模式下牙鲆仔稚幼鱼肠道菌群结构及演替规律。

关键词 牙鲆; 仔稚幼鱼; 肠道菌群; 16S rRNA 测序

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2017)01-0111-09

肠道作为微生物大量存在的栖息地, 不仅形成了复杂的肠道微生态系统(Björkstén, 2006), 而且作为宿主生命活动的有机组成部分, 对宿主的生长发育具有重要的影响(Ley *et al*, 2008; Suez *et al*, 2014)。肠道菌群对鱼类的健康发挥重要作用(Austin, 2006; 孙云章等, 2008; Round *et al*, 2009; Wei *et al*, 2010), 例如, 肠道微生物可以调节斑马鱼(*Danio rerio*)消化道基因的表达, 促进营养代谢和免疫反应(Rawls *et al*, 2004)。不同的鱼类具有各自独特的肠道菌群结构, 而且与外部环境条件密切相关, 生长发育阶段、营养状况、性

别和消化系统的复杂性等都会对肠道菌群的形成及多样性产生影响(Kim *et al*, 2007; Nayak, 2010; Stephens *et al*, 2016)。鱼类的肠道微生态系统是后天形成的(Yan *et al*, 2016), 因此, 了解鱼类肠道菌群的演替和定植过程, 对鱼类肠道微生态系统平衡调控具有重要意义。以往对鱼类肠道微生物群落形成及多样性的研究, 大多采用传统的梯度稀释平板法, 分离培养肠道微生物来研究其结构组成(Griffiths *et al*, 2001; Huber *et al*, 2004; Jensen *et al*, 2002), 其缺点是肠道微生物种群中有诸多菌群目前尚无法分离培养。近年

* 国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50)和国家自然科学基金项目(31201982; 31502145)共同资助 [This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-50) and the National Natural Science Foundation of China (31201982; 31502145)]. 刘增新, E-mail: lyxzal@163.com

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-08-16, 收修改稿日期: 2016-09-19

来, 变性梯度凝胶电泳法(DGGE)和高通量测序技术被应用于研究鱼类肠道微生物群落结构(Dhanasiri *et al.*, 2011; 李金金等, 2013; Giatsis *et al.*, 2015), 但 DGGE 方法在实验结果中只能反应出样品中的优势菌种, 无法得到样品中细菌种类的绝对数量, 而且难以进行大量样本的测序分析、深入了解肠道菌群的复杂组成, 高通量测序技术弥补了这一缺陷(Suenaga, 2012; 夏围围等, 2014)。

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)作为我国重要的海水养殖经济鱼类, 了解其肠道菌群结构变化和功能特性, 对牙鲆的健康养殖至关重要。李存玉等(2015)研究了池塘和工厂化 2 种不同养殖条件下的牙鲆成鱼肠道菌群多样性; Kim 等(2013)对养殖条件下的牙鲆与野生牙鲆的肠道微生物进行了比较分析。对于牙鲆仔稚幼鱼肠道微生物的研究仅见 Eddy 等(2002)和 Verner-Jeffreys 等(2003), 他们采用传统的细菌培养方法, 报道了仔稚幼鱼肠道菌群的影响因素。本研究通过 MiSeq 16S rRNA 高通量测序的方法, 分析牙鲆仔稚幼鱼发育阶段肠道菌群多样性及其形成过程, 旨在揭示工厂化人工育苗模式下牙鲆仔稚幼鱼肠道菌群结构, 为深入研究牙鲆养殖过程中肠道菌群形成机制及调控技术提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 苗种来源

野生亲鱼经过驯化后, 待性腺发育成熟, 通过人

工授精的方式获取健康的受精卵。在青岛贝宝海洋科技有限公司进行苗种培育, 采用牙鲆工厂化人工育苗方法, 在 5 m×5 m×1 m 的方形抹角水泥池中进行。苗种培育的水环境条件: 水温为 18–20℃, 溶氧量为 5 mg/L 以上, 盐度为 30, $\text{NH}_4^+\text{-N} \leq 0.1 \text{ mg/L}$, 换水率为 50%–300%。苗种培育的饵料系列为轮虫–卤虫–配合饲料, 4–19 日龄投喂轮虫(5–8 ind/ml 培育水体); 17–39 日龄投喂卤虫(0.5–1.0 ind/ml 培育水体); 25 日龄时开始投喂配合饲料, 随着苗种的生长, 逐步增加饲料的投喂量和饲料颗粒粒径(图 1)。

1.2 样品采集与保存

2015 年 5–9 月进行样品采集, 所有样品来自同一批受精卵、同一个育苗池的牙鲆苗种。根据牙鲆摄食饵料的种类和生长发育阶段, 分别于 1 日龄、9 日龄、21 日龄、45 日龄、80 日龄和 115 日龄采取仔稚幼鱼肠道样品(图 1 中的黑色菱形标注了取样时间), 分别编号为 G1、G2、G3、G4、G5、G6。因为 G1 的样品为初孵仔鱼, 无法区分肠道, 所以将初孵仔鱼整体保存; G2–G6 时期的样品均只取肠道。取样时, 提前进行停食处理 12 h 以上, 排空消化道内残留食物。在无菌环境下取样, 首先用无菌水将样品表面冲洗干净; 然后于无菌培养皿中将肠道迅速取出后, 使用无菌水冲洗 3 次以上, 立刻置于液氮中保存; 同一阶段样品设置 3 个生物重复样, 每组样品根据鱼的大小分别取 50 尾×3 (G1)、50 尾×3 (G2)、30 尾×3 (G3)、5 尾×3 (G4)、3 尾×3 (G5)和 3 尾×3 (G6); 每次取样的同时测量鱼的全长(表 1)。

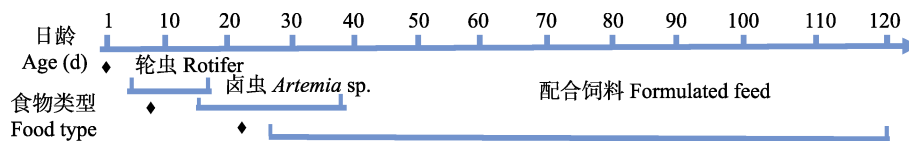


图 1 牙鲆仔稚幼鱼饵料系列示意

Fig.1 Feeding pattern during *P. olivaceus* early life stages, 1 to 120 day-post-hatching

◆表示取样点

◆ denoted sampling point

表 1 实验取样信息

Tab.1 Information of collected samples of the experiment

采样时间(日龄) Sampling time (Day)	组别 Group	采样数量(尾) Number of samples (ind)	饲料类型 Food type	平均全长 Average total length (mm)
1	G1	50×3		3.0±0.3
9	G2	50×3	轮虫 Rotifer	5.0±0.5
21	G3	30×3	卤虫 Artemia	9.5±0.6
45	G4	5×3	配合饲料 Formulated feed	25.0±3.2
80	G5	3×3	配合饲料 Formulated feed	56.1±5.4
115	G6	3×3	配合饲料 Formulated feed	87.0±8.6

1.3 DNA 提取与 PCR 扩增

使用 QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, 德国)提取 1.2 中肠道样品的 DNA, 并进行琼脂糖凝胶电泳和 DNA 浓度检测, 以确保所提取 DNA 质量能够满足后续扩增要求。根据 16S rRNA 基因序列特点和 Miseq 平台测序要求, 针对 V3-V4 区域设计特异引物 338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3', 806R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3' 进行 PCR 扩增。20 μ l PCR 反应体系: 5 \times FastPfu Buffer 4 μ l, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μ l, Forward Primer (5 μ mol/L) 0.8 μ l, Reverse Primer (5 μ mol/L) 0.8 μ l, FastPfu Polymerase 0.4 μ l, BSA 0.2 μ l, Template DNA 10 ng, 补 ddH₂O 至 20 μ l。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 27 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物定量和均一化处理后使用 MiSeq 平台测序分析(上海欧易生物医药科技有限公司)。

1.4 数据处理与分析

生物信息分析流程: 由 Illumina MiSeq 测序所得原始数据进行去杂、拼接, 对所有的优质序列使用 UPARSE clustering 方法以相似度 97% 进行 OTU 分类。随后使用 PyNAST 以 OTU 分类中丰度最大的序列为代表序列与 GreenGenes 数据库进行比对, 以置信度 ≥ 0.8 进行物种分类注释, 进一步进行 α 多样性和 β 多样性的分析。

肠道菌群 α 多样性分析主要包括 OTU 丰度分析、物种多样性指数分析和物种系统发育分析, 用于说明整个发育阶段内肠道菌群的组成和结构变化; 肠道菌群 β 多样性分析主要基于 Unweight Unifrac 距离和 OTU 丰度, 采取单因素方差分析(One-way ANOVA) 和 LEfSe 分析方法进行分析。所有的统计分析均使用 QIIME、R 语言软件完成。统计数据均以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)的形式表示。

2 结果与分析

2.1 基于 16S rRNA 测序的肠道菌群多样性

对牙鲆仔稚幼鱼肠道样品 16S rRNA 数据分析, 18 个测序样品共获得 489922 条有效序列, 根据 97% 的相似度进行 OTU 分类, 获得 7462 个 OTU。将每组的 3 个重复样品平均或合计后获得 6 组样品的 OTU 数据见表 2。其中, G1、G2、G3、G4、G5 和 G6 的 OTU 的平均值分别为(1298 \pm 99)、(768 \pm 72)、(400 \pm 61)、(754 \pm 176)、(1337 \pm 527)和(886 \pm 107)。通过与数据库 16S 序列比对, 以置信度 ≥ 0.8 进行物种分类注释, 在门(Phylum)分类水平上共有 42 个门的菌群种类, 在属(Genus)分类水平上有 972 个属的细菌种类(表 2)。其中, G1 时期共有 38 个门 490 个属, G2 时期共有 38 个门 588 个属, G3 时期的微生物种类最少, 只有 25 个门对应 254 个属; 从 G4 时期开始微生物种类显著增加, G4 中共有 32 个门 378 个属, 而 G5 时期增加到 36 个门 498 个属, G6 时期共有 39 个门 336 个属。

对牙鲆仔稚幼鱼的 6 组样品的系统发育多样性指数单因素方差分析发现, 不同日龄牙鲆肠道的菌群进化多样性指数具有显著差异, 这与每组样品对应的菌群种类相一致。初孵仔鱼 G1 的进化多样性指数与 G2、G3 样品有明显差异; G1 和 G5 的进化多样性指数最高, G3 的最低($P < 0.05$)(图 2-A)。另外, 对 5 组摄食后的仔稚幼鱼肠道样品(G2、G3、G4、G5、G6) 的香农指数拟合线性回归分析显示, 随着日龄的增加, 仔稚幼鱼的肠道菌群物种多样性逐渐增加 ($R^2=0.596$, $P < 0.05$)(图 2-B)。

2.2 仔稚幼鱼肠道菌群门水平的结构组成

在门的分类水平上, 将每组样品中 OTU 对应菌种的相对丰度占该样品总 OTU $\geq 0.10\%$ 的前 22 个菌门的相对丰度进行比较(图 3), 其中的 7 个优势细菌

表 2 牙鲆仔稚幼鱼样品 16S rRNA 测序数据

Tab.2 16S rRNA sequencing data summary for samples of *P. olivaceus* during early life stages

样品 Samples	有效序列数 Number of valuable sequences	可操作 分类单元 OTUs	香农指数 Shannon index	系统发育 多样性指数 Phylogenetic diversity	门水平数量 Number of phylum	纲水平数量 Number of class	科水平数量 Number of family	属水平数量 Number of genus
G1	29838	1298	7.4437	92.3561	38	92	284	490
G2	28758	768	4.9564	80.7866	38	105	351	588
G3	29322	400	2.4869	36.8243	25	51	157	254
G4	26288	754	3.2229	63.1753	32	87	247	378
G5	23787	1337	6.1978	103.6931	36	112	330	498
G6	25313	886	6.3906	68.7697	39	71	225	336

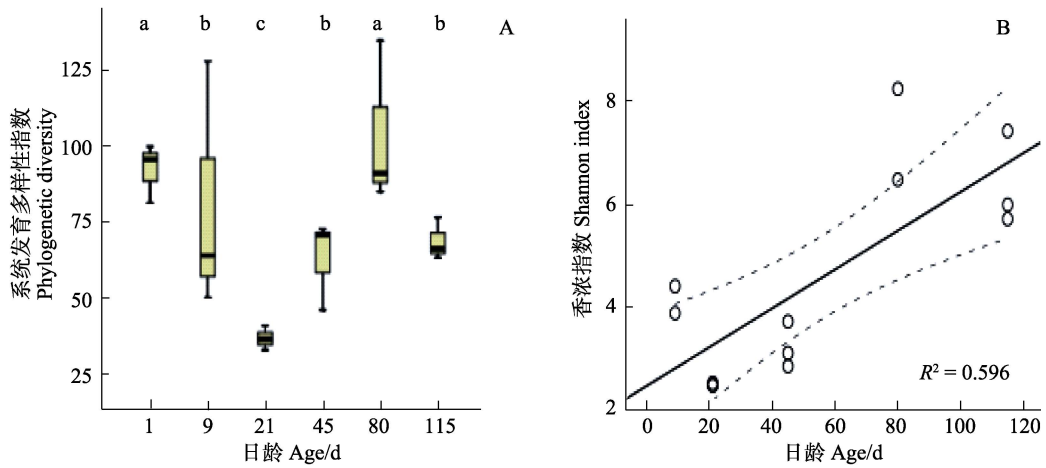


图 2 α 多样性指数分析
Fig.2 Analysis of bacteria alpha diversity

A: 系统发育多样性指数($P<0.05$); B: 9 日龄后样品香农指数($P<0.05$)

A: Comparison of phylogenetic diversity ($P<0.05$); B: Regression model of Shannon index after 9 d ($P<0.05$)

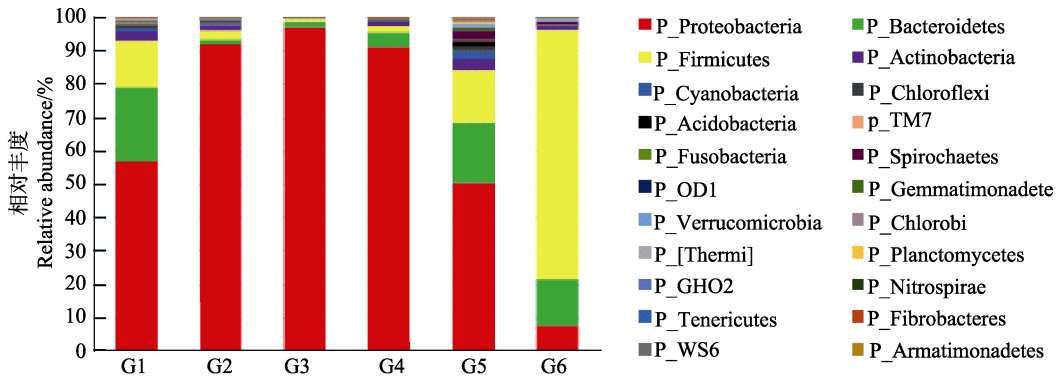


图 3 牙鲆仔稚鱼肠道菌群组成(门水平分类)

Fig.3 Composition of intestinal bacterial community of *P. olivaceus* during early life stages at phylum taxonomic level

G1: 1 日龄; G2: 9 日龄; G3: 21 日龄; G4: 45 日龄; G5: 80 日龄; G6: 115 日龄

G1: 1 d; G2: 9 d; G3: 21 d; G4: 45 d; G5: 80 d; G6: 115 d

门类的相对丰度见表 3。由图 3 和表 3 可知, 变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和放线菌门(Actinobacteria) 四者对应 OTU 的相对丰度在各时期(除 G5 时期的 85%外)均占该组样品总 OTU 的 90%以上。G1 期样品为初孵仔鱼, 其主要优势菌群种类在门水平上与摄食后的仔稚幼鱼肠道样品基本相同, 但在丰度上有较大差别。摄食后, 随着仔稚幼鱼生长发育其肠道菌群丰度从门水平上看, 变形菌门的相对丰度逐渐降低; 厚壁菌门和拟杆菌门的相对丰度逐渐增加; 放线菌门的相对丰度基本稳定, 只在 G3 时期有所下降; 蓝藻菌门(Cyanobacteria)在各时期的相对丰度均很低, 仅在 G5 时期出现短暂增加。相对丰度前 4 位的变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门、放线菌门在牙鲆仔稚幼鱼肠道菌

群的形成和演替过程中一直处于优势菌群地位。

2.3 仔稚幼鱼肠道菌群属水平的结构组成变化

在相对丰度最高的前 4 个菌门中, 筛选各时期样品中曾经出现过 OTU 相对丰度>1%并且明确鉴定到属的菌(相似度 $\geq 97\%$)作为优势菌属, 进行 LefSe (LDA effect size)分析(Kruskal-Wallis, $P<0.05$; Wilcoxon test, $P<0.05$; LDA score>4.0), 从而确定组与组之间具有统计学差异的生物标识, 即组间差异显著的物种(表 4)。在 G1-G6 的 6 组样品中共筛选出 29 个菌属, 其中, 15 个属于变形菌门, 8 个属于厚壁菌门中, 5 个属于拟杆菌门, 1 个属于放线菌门。

变形菌门各菌属的组成变化: G1 时期 OTU 相对丰度>1%的共有 11 个菌属, 其相对丰度水平较低,

表 3 牙鲆仔稚幼鱼肠道优势细菌门类及相对丰度(%)
Tab.3 Dominant bacterial phyla and the relative abundance for samples of *P. olivaceus* during early life stages (%)

分类 Taxon	组别 Group					
	G1	G2	G3	G4	G5	G6
变形菌门 Proteobacteria	55.20	90.29	97.07	90.55	48.92	7.78
拟杆菌门 Bacteroidetes	21.58	1.37	1.69	4.40	17.44	13.78
厚壁菌门 Firmicutes	13.37	2.70	0.70	1.84	15.09	74.43
放线菌门 Actinobacteria	2.71	1.60	0.20	1.23	3.17	1.33
蓝藻菌门 Cyanobacterium	1.08	0.36	0.03	0.20	2.32	0.20
绿弯菌门 Chlorobacteria	0.74	0.98	0.04	0.27	1.22	0.20
酸杆菌门 Acidobacteria	0.41	0.48	0.03	0.22	1.06	0.10

G2–G6 时期 OTU 相对丰度>1%的菌属数量分别为 6、3、5、6、2。其中, G1 期具有重要贡献值(LDA 值>4)($P<0.05$)的交替单细胞菌属(*Alteromonas*)、海单细胞菌属(*Marinomonas*)和假交替单细胞菌属(*Pseudoalteromonas*), 在 G2–G5 时期逐渐减少, 到 G6 时期几乎消失, 未能作为肠道主要菌群而定植。弧菌属(*Vibrio*)在 G2–G4 时期相对丰度显著增高, 在 G4 时期达到 60.56%, 而到 G5、G6 时期相对丰度锐减至低水平(0.28%); 伯克氏菌属(*Burkholderia*)、*Nautella*、弓形杆菌属(*Arcobacter*)和 *Aliivibrio* 在 G2–G5 时期虽然相对丰度一度较高, 但到 G6 时期其相对丰度很低(几乎检测不到), 未在幼鱼期定植为优势菌属; 假单胞菌属(*Pseudomonas*)、萨特氏菌属(*Sutterella*)、埃希氏杆菌属(*Escherichia*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)的相对丰度在各时期均处于较低水平, 但一直存在于肠道内; 萨特氏菌属在 G2–G5 阶段相对丰度<0.1%, 在 G6 时期增加到 1.25%, 此时, 该菌在牙鲆幼鱼的肠道中可能已成为优势菌属。

拟杆菌门各菌属的组成变化: G1 时期 OTU 相对丰度>1%的共有 3 个菌属, G2–G6 时期相对丰度>1%的菌属数量分别为 0、0、2、2、2。拟杆菌属(*Bacteroides*)和普氏菌属(*Prevotella*)从 G4 时期开始增加, 到 G5 和 G6 时期到达较高水平, 可能已定植成为肠道优势菌群, 其贡献率显著(LDA 值>4)($P<0.05$); *Cryomorphaceae* 某属在 G1 时期的丰度最高, 但在 G2–G6 时期持续降低直至未检测出; 极地杆菌属(*Polaribacter*)的丰度逐

渐增加, 在 G5 时期达到较高丰度, 但在 G6 时期表达极少, 尚未固定成为优势菌群。

厚壁菌门各菌属的组成变化: G1 时期 OTU 相对丰度>1%的共有 2 个菌属, 且相对丰度均在 1%左右, G2–G6 时期 OTU 相对丰度>1%的菌属数量分别为 0、0、0、2、8。厚壁菌门各菌属在牙鲆摄食活饵料时的 G2–G3 时期丰度非常低, 尤其是 G3 时期各菌属的相对丰度<0.05%。其中, 布劳特氏菌属(*Blautia*)、颤螺菌属(*Oscillospira*)、毛螺科菌某属和瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)在转换饲料后的 G4 时期相对丰度增加, 到 G6 时期成为相对丰度最高的前 4 位优势菌属(相对丰度>5%); 考拉杆菌属(*Phascolarctobacterium*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)在 G5 时期才开始增加, G6 时期相对丰度>2%, 成为优势菌属。厚壁菌门的 8 个菌属在 G6 时期均发展成为优势菌属, 其中, 布劳特氏菌等 6 个菌属在 G6 时期的贡献率显著(LDA 值>4; $P<0.03$)。

3 讨论

鱼类的肠道菌群在其生长发育过程中参与重要的生理活动, 与鱼类的健康生长密切相关。鱼类仔稚幼鱼阶段是肠道菌群群落形成的关键时期, 在该阶段水环境和食物中的微生物开始进入肠道, 随着鱼类的生长不断演替最后完成定植(Egert *et al.*, 2005; Austin, 2006; Knapp *et al.*, 2010; Ley *et al.*, 2008)。鲆鲽类作为重要的养殖经济鱼类, 其肠道微生物的研究一直备受关注(Thomson *et al.*, 2005; Sugita *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2013)。本研究利用 MiSeq 16S rRNA 高通量测序技术和生物信息学分析方法, 深入认识了工厂化人工育苗条件下牙鲆仔稚幼鱼肠道菌群结构及变化, 在门、属水平分类基础上, 详细阐述了肠道菌群的结构组成特点以及随生长发育过程的演替变化规律。传统方法分离培养发现, 大西洋庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*)和大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)肠道微生物群落中的弧菌属在仔稚幼鱼摄食后丰度明显增加并成为优势菌属, 但随着饵料的改变, 其数量迅速减少(Verner-Jeffreys *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2002; 史秀清等, 2015)。此结果与本研究中弧菌属在仔稚幼鱼肠道中的变化规律相似。但肠道微生物种群中有诸多菌群目前尚无法分离培养, 限制了整体菌群结构的分析。本研究在牙鲆仔稚幼鱼肠道菌群中发现了 42 个菌门下的 972 个菌属, 并分析其优势菌属的变化规律, 较全面地反映了肠道菌群结构的多样性变化。

表4 相对丰度>1%菌属 LEfSe 分析
Tab.4 LEfSe analysis on genus level (the relative abundance > 1%)

分类 Taxon	分组 Group						LDA	Group	P value
	G1 (%)	G2 (%)	G3 (%)	G4 (%)	G5 (%)	G6 (%)			
拟杆菌门 Bacteroidetes	21.57	1.37	1.69	4.39	17.44	13.78	-	-	-
拟杆菌属 <i>Bacteroides</i>	1.55	0.13	0.06	0.17	0.89	2.87	4.39	G6	0.02
蟑螂杆状体科 Cryomorphaceae	5.51	0.06	0.18	0.14	0.13	0.01	4.87	G1	0.02
极地杆菌属 <i>Polaribacter</i>	0.95	0.02	0.04	1.02	2.09	0.01	4.47	G5	0.03
普氏菌属 <i>Prevotella</i>	1.14	0.17	0.06	0.15	3.22	2.75	4.64	G5	0.03
<i>Winogradskyella</i>	0.08	0.02	0.04	1.25	0.00	0.00	-	-	-
厚壁菌门 Firmicutes	13.37	2.70	0.71	1.84	15.09	74.43			
布劳特氏菌 <i>Blautia</i>	0.22	0.03	0.01	0.04	0.29	10.65	4.94	G6	0.02
真细菌属 <i>Eubacterium</i>	0.04	0.00	0.00	0.00	0.06	1.85	4.19	G6	0.02
颤螺菌属 <i>Oscillospira</i>	0.63	0.11	0.02	0.09	1.59	5.91	4.69	G6	0.02
瘤胃球菌属 <i>Ruminococcus</i>	1.00	0.14	0.04	0.10	0.93	5.98	4.71	G6	0.02
毛螺菌科 Lachnospiraceae	0.99	0.11	0.02	0.13	1.63	17.34	5.14	G6	0.03
考拉杆菌属 <i>Phascolarctobacterium</i>	0.28	0.04	0.00	0.01	0.52	4.41	4.52	G6	0.03
乳杆菌属 <i>Lactobacillus</i>	1.72	0.37	0.23	0.09	0.42	2.95	-	-	-
粪球菌属 <i>Coprococcus</i>	0.28	0.02	0.01	0.02	0.33	1.79	-	-	-
变形菌门 Proteobacteria	55.20	90.29	97.07	90.55	48.92	7.78	-	-	-
弧菌科 Vibrionaceae	2.89	9.75	24.43	10.13	0.00	0.00	5.40	G3	0.01
海单胞菌属 <i>Marinomonas</i>	1.92	0.27	0.09	0.05	0.00	0.00	4.41	G1	0.02
交替单胞菌属 <i>Alteromonas</i>	1.22	0.38	0.30	0.27	0.04	0.01	4.21	G1	0.02
弧菌属 <i>Vibrio</i>	2.51	31.92	50.77	60.56	0.15	0.28	5.82	G4	0.02
假交替单胞菌属 <i>Pseudoalteromonas</i>	7.28	4.65	1.95	0.40	0.50	0.03	4.99	G1	0.03
弓形杆菌属 <i>Arcobacter</i>	0.13	2.33	0.35	0.02	0.03	0.00	4.42	G2	0.03
<i>Aliivibrio</i>	0.01	0.15	0.24	2.28	0.02	0.00	4.40	G4	0.03
<i>Nautella</i>	0.02	0.00	0.01	0.94	1.76	0.03	4.39	G5	0.03
伯克氏菌属 <i>Burkholderia</i>	0.44	0.19	0.00	0.21	8.27	0.05	5.06	G5	0.05
萨特氏菌属 <i>Sutterella</i>	0.19	0.02	0.00	0.02	0.09	1.25	-	-	-
脱硫弧菌属 <i>Desulfovibrio</i>	1.03	0.00	0.01	0.01	0.05	0.14	-	-	-
埃希氏杆菌属 <i>Escherichia</i>	3.22	2.15	0.19	1.07	3.11	0.84	-	-	-
不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i>	1.83	0.45	0.05	0.31	1.02	0.14	-	-	-
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	6.80	5.61	0.56	2.94	8.16	2.28	-	-	-
发光杆菌属 <i>Photobacterium</i>	0.01	0.00	0.00	0.05	4.97	0.14	-	-	-
放线菌门 Actinobacteria	2.71	1.60	0.20	1.13	3.17	1.33	-	-	-
丙酸菌属 <i>Propionibacterium</i>	1.28	0.94	0.12	0.55	1.15	0.35	-	-	-

“-” 该菌属在各时期差异不显著，其丰度仅在某个时期达到了1%

“-” indicated that the relative abundance of the genus in different stages were not significantly different. Its relative abundance just reached 1% in a certain period

以往研究中发现轮虫和卤虫中含有大量的弧菌 (Rawls *et al*, 2006; Bjornsdottir *et al*, 2009), 在仔鱼开口后, 肠道菌群内弧菌属细菌数量迅速增加, 取代假交替单胞菌属成为优势菌 (Bergh *et al*, 1994; Eddy *et al*, 2002; Verner-Jeffreys *et al*, 2003; 史秀清等,

2015)。Picchiatti 等(2007)在研究中指出, 以卤虫和轮虫为载体, 能够有效地帮助益生菌进入仔稚幼鱼肠道内定植。肠道菌落的形成与摄食饲料关系密切, 草鱼 (*Carassius auratus gibelio*) 的肠道菌群会随着食物的改变而变化 (Wu *et al*, 2012); 配合饲料中植物性蛋白

会影响金头鲷(*Sparus aurata*)的肠道菌群结构(Estruch *et al.*, 2015); 另外, 消化道微生物种间也存在生存竞争关系, 有限的肠道环境内微生物种间竞争强度会影响肠道微生物的种类数量(Schryver *et al.*, 2014)。本研究发现在仔鱼期的牙鲆开始摄食轮虫后, 肠道的优势菌群结构较单一, 变形菌门中的弧菌属最先成为仔鱼期肠道菌群的绝对优势菌; 在摄食配合饲料后, 变形菌门的相对丰度显著降低, 厚壁菌门和拟杆菌门的相对丰度明显增大, 在幼鱼阶段替代变形菌门成为肠道菌群的绝对优势菌群, 其中, 瘤胃球菌属、布劳特氏菌丰度最高。作者认为, 在牙鲆仔鱼开始摄食后, 作为饵料的轮虫和虫所携带的菌群对仔稚幼鱼的肠道菌群结构具有较大影响, 从食物转为配合饲料后, 肠道菌群中由食物带来的菌群的变化逐渐稳定, 同时, 牙鲆自身也会有目的的筛选有益菌株, 从而使肠道微生态系统达到相对稳定状态。说明摄食饵料的类型与牙鲆仔稚幼鱼肠道菌群结构的变化关系密切。关于饵料对牙鲆肠道菌群结构及变化规律的影响有待深入研究。

本研究中, 80 日龄后的牙鲆幼鱼肠道菌群趋向稳定, 形成了以厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门和放线菌门为主的菌群组成, 这与养殖牙鲆成鱼在门水平上的肠道优势菌群结构相似, 但是在属水平上其结构却有较大差异(李存玉等, 2015)。牙鲆成鱼肠道中作为优势菌存在的芽孢杆菌属和不动杆菌属, 在幼鱼时期肠道中的丰度却较低; 而幼鱼肠道的绝对优势菌属在成鱼肠道中不占主要地位。因此, 虽然在仔稚幼鱼阶段牙鲆肠道菌群形成了以瘤胃球菌属、布劳特氏菌属和拟杆菌属等为优势菌属的肠道菌群组成, 但是随牙鲆幼鱼的生长发育其肠道菌群的结构仍会发生变化。此外, 牙鲆的肠道优势菌与其生活环境有关, Kim 等(2013)研究发现, 野生牙鲆的肠道微生物种类丰富度显著大于养殖牙鲆, 且当牙鲆处于较为复杂的环境中, 其肠道内的有益菌数量和种类会增加。在池塘养殖条件下, 牙鲆肠道的芽孢杆菌属和野生牙鲆肠道的乳酸杆菌属的种类和数量远高于工厂化养殖条件下的牙鲆肠道。

本研究测定的初孵仔鱼的菌群结构多样性丰富, 但其肠道菌群与摄食后的仔稚幼鱼肠道菌群结构明显不同。因为该样品是整条初孵仔鱼, 此时肠道尚未形成, 无法取肠道与后续其他各期的肠道样品进行同步比较。实验结果显示, 初孵仔鱼的体内部分微生物是在摄食后的仔稚幼鱼肠道中不存在或逐渐消失的菌群, 这些菌群可能来源于母源卵子或受精卵, 也可

能在受精卵孵化时由水环境中介入, 然而这些菌群均无法在仔稚幼鱼肠道内定植。另外一部分菌群在后期仔稚幼鱼发育过程的肠道中一直延续存留下来, 成为肠道菌群的组成部分, 他们可能具有母源遗传特征。因此, 今后应进一步深入开展牙鲆肠道菌群组成与亲本母源的关系研究。

参 考 文 献

- Austin B. The bacterial microflora of fish, revised. Scientific World Journal, 2006(6): 931-945
- Bergh Ø, Naas KE, Harboe T. Shift in the intestinal microflora of atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae during first feeding. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1994, 51(8): 1899-1903
- Björkstén B. The gut microbiota: A complex ecosystem. Clinical and Experimental Allergy, 2006, 36(10): 1215-1217
- Bjornsdottir R, Johannsdottir J, Coe J, *et al.* Survival and quality of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in intensive farming: Possible impact of the intestinal bacterial community. Aquaculture, 2009, 286(1-2): 53-63
- Dhanasiri A, Brunvold L, Brinchmann M, *et al.* Changes in the intestinal microbiota of wild atlantic cod *Gadus morhua* L. upon captive rearing. Microbial Ecology, 2011, 61(1): 20-30
- Eddy SD, Jones SH. Microbiology of summer flounder *Paralichthys dentatus* fingerling production at a marine fish hatchery. Aquaculture, 2002, 211(1-4): 9-28
- Egert M, Stingl U, Bruun LD. Structure and topology of microbial communities in the major gut compartments of *Melolontha melolontha* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(8): 4556-4566
- Estruch G, Collado MC, Peñaranda DS, *et al.* Impact of fishmeal replacement in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) on the gastrointestinal microbiota determined by pyrosequencing the 16S rRNA gene. PLoS One, 2015, 10(8): e0136389
- Giatsis C, Sipkema D, Smidt H, *et al.* The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. Scientific Reports, 2015(5): 18206
- Griffiths S, Melville K, Cook M, *et al.* Profiling of bacterial species associated with haddock larviculture by PCR amplification of 16S rDNA and denaturing gradient gel electrophoresis. Journal of Aquatic Animal Health, 2001, 13(4): 355-363
- Huber I, Spanggaard B, Appel KF, *et al.* Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Journal of Applied Microbiology, 2004, 96: 117-132
- Jensen S, Bergh O, Enger O, *et al.* Use of PCR-RFLP for

- genotyping 16S rRNA and characterizing bacteria cultured from halibut fry. *Canadian Journal of Microbiology*, 2002, 48(5): 379–386
- Kim DH, Brunt J, Austin B. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102: 1654–1664
- Kim DH, Kim DY. Microbial diversity in the intestine of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 2013, 414–415: 103–108
- Knapp BA, Seeber J, Rief A. Bacterial community composition of the gut microbiota of *Cylindroiulus fulviceps* (Diplopoda) as revealed by molecular fingerprinting and cloning. *Folia Microbiologica*, 2010, 55(5): 489–496
- Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, *et al.* Worlds within worlds: Evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(10): 776–788
- Li CY, Liu XZ, Xu YJ, *et al.* Comparative analysis of composition, diversity and origin of intestinal bacterial community in pond-and indoor tank-culture Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(2): 245–255 [李存玉, 徐永江, 柳学周, 等. 池塘和工厂化养殖牙鲆肠道菌群结构的比较分析. *水产学报*, 2015, 39(2): 245–255]
- Li JJ, Ni JJ, Li XM, *et al.* Relationship between gastrointestinal bacterial structure and development of *silurus soldatovi meridionalls* chen. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(4): 613–619 [李金金, 倪加加, 李学梅, 等. 南方大口鲶消化道细菌群落结构与其胃肠分化的关系. *水生生物学报*, 2013, 37(4): 613–619]
- Nayak SK. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 2010, 41(11): 1553–1573
- Picchiatti S, Mazzini M, Taddei AR, *et al.* Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: Immunohistochemical and ultrastructural studies. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 22(1–2): 57–67
- Rawls J, Samuel B, Gordon J. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101(13): 4596–4601
- Rawls JF, Mahowald MA, Ley RE, *et al.* Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection. *Cell*, 2006, 127(2): 423–433
- Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9(5): 313–323
- Schryver PD, Vadstein O. Ecological theory as a foundation to control pathogenic invasion in aquaculture. *The ISME Journal*, 2014, 8(12): 2360–2368
- Shi XQ, Zhang Z, Wang YG, *et al.* The characteristics of culturable bacterial microflora in the gastrointestinal tract of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(4): 73–82 [史秀清, 张正, 王印庚, 等. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)仔稚鱼发育期消化道可培养细菌的菌群特征分析. *渔业科学进展*, 2015, 36(4): 73–82]
- Stephens WZ, Burns AR, Stagaman K, *et al.* The composition of the zebrafish intestinal microbial community varies across development. *The ISME Journal*, 2016, 10(3): 644–654
- Suenaga K. Targeted metagenomics: A high-resolution metagenomics approach for specific gene clusters in complex microbial communities. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(1): 13–22
- Suez J, Korem T, Zeevi D, *et al.* Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*, 2014, 514(7521): 181–186
- Sugita H, Ito Y. Identification of intestinal bacteria from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and their ability to digest chitin. *Letters in Applied Microbiology*, 2006, 43(3): 336–342
- Sun YZ, Yang HL. A review: Distribution and manipulation of fish gut microflora. *Fisheries Science*, 2008, 27(5): 257–261 [孙云章, 杨红玲. 浅谈鱼类消化道微生物的分布及调控. *水产科学*, 2008, 27(5): 257–261]
- Thomson R, Macpherson H, Riaza A, *et al.* *Vibrio splendidus* biotype 1 as a cause of mortalities in hatchery-reared larval turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99(2): 243–250
- Verner-Jeffreys DW, Shields RJ, Bricknell IR, *et al.* Changes in the gut-associated microflora during the development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae in three British hatcheries. *Aquaculture*, 2003, 219: 21–42
- Wei H, Dong L, Wang T, *et al.* Structural shifts of gut microbiota as surrogate endpoints for monitoring host health changes induced by carcinogen exposure. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 73(3): 577–586
- Wu S, Wang G, Angert ER, *et al.* Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30440
- Xia WW, Jia ZJ. Comparative analysis of soil microbial communities by pyrosequencing and DGGE. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(12): 1489–1499 [夏围围, 贾仲君. 高通量测序和 DGGE 分析土壤微生物群落的技术评价. *微生物学报*, 2014, 54(12): 1489–1499]
- Yan QY, Li JJ, Yu YH, *et al.* Environmental filtering decreases with fish development for the assembly of gut microbiota. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(12): 4739–4754

Composition of Intestinal Bacterial Community of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) During Early Life Stages

LIU Zengxin^{1,2}, LIU Xuezhou^{1,2①}, SHI Bao¹, XU Yongjiang¹, LIU Quan^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract A healthy microbial community in digestive tract is critically important during early life stages of fish. To examine the microbial diversity in the gastrointestinal tract of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), we surveyed the intestinal bacteria of *P. olivaceus* during the larvae and juvenile stages. In this study, Illumina MiSeq of 16S rRNA and biological information analysis method were used to explore the intestinal bacterial community composition in indoor tank-culture system. Sampling was carried out throughout the larvae and juvenile stages for six time points. The obtained 7462 operational taxonomic units (OTUs) were classified into 42 bacterial species and 972 genera. The results indicated that larval fish (1 day-post-hatch; dph) displayed a distinct and diversified gut microflora, with Proteobacteria, Bacteroidete and Firmicutes dominating the community structure. During the age of 9 and 21 dph, Proteobacteria population increased significantly and remained to be the main species. By comparison, Firmicutes had fast turnover rate and increased sharply at 45 dph after feeding formulated food. The change of intestinal dominant microflora genus was also significant. The relative abundance of *Vibrio* was the highest during the period of live feed (9 and 21 dph sampling), and was the lowest level after feeding formulated feed (115 dph). By contrast, the *Bacteroides* and *Prevotella* became the predominant intestinal bacteria at 80 dph, whereas Firmicutes became a core microbiota at 80 dph. *Blautia* and other related genus colonized in the intestinal tract of *P. olivaceus* and became the dominant microbiota between 80 and 115 dph. The results revealed the change and establishment of microbiota during the transition stages from larvae to juvenile in response to live and formulated feed. Our results provided a database for analyzing the role of the intestinal micro ecological system of *P. olivaceus* at larvae and juvenile stages and have important implication for larval production of *P. olivaceus*.

Key words *Paralichthys olivaceus*; Larvae, juvenile and young fish; Gut microbiome; MiSeq 16S rRNA

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

两株有益菌的分离、培养、鉴定 及其水质调控效果评价*



李存玉^{1,3} 柳学周^{1,2①} 徐永江^{1,2} 史宝^{1,2} 郑伟⁴ 史学营^{1,3}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 中国水产科学研究院
黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛
266071; 3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 4. 日照市生态环境研究所 日照 276805)

摘要 自河口污泥中分离到两株有益菌,通过形态分析、革兰氏染色、生理生化测定、16S rRNA 序列分析和系统发育树构建,其中一株鉴定为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*),另一株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。建立了两株细菌的适宜生长条件,植物乳杆菌适宜生长 pH 为 6.5、温度为 30℃,枯草芽孢杆菌的适宜生长 pH 为 6.0、温度为 36℃。在实验室条件下,两株有益菌 1:1 组合制剂对人工配制的海水中氨氮、亚硝酸盐、磷酸盐的降解率分别达到了 73.2%、58.0%和 52.4%;池塘养殖环境下,其对养殖水体中氨氮、亚硝酸盐、磷酸盐的降解率分别达到了 86.3%、88.9%和 68.3%,具有明显的水质净化效果。本研究结果可为建立两株有益菌的规模化发酵生产技术和生产应用奠定基础。

关键词 植物乳杆菌; 枯草芽孢杆菌; 菌种鉴定; 水质调控

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0120-08

在鱼类集约化养殖条件下,高密度饲养容易在养殖池内蓄积较高浓度的氨氮和亚硝酸盐等有害物质,导致有害菌和条件致病菌大量滋生,从而降低鱼体抗病力,极易诱发疾病(Torrecillas *et al*, 2007)。微生态调控是从生态学角度对养殖水环境进行修复的一种安全、无污染、无残留的水质调控技术,其原理主要是通过益生菌改善养殖水环境及养殖鱼类肠道中的菌群结构,降低养殖水体中有害物质的浓度或者抑制病原菌的繁殖(Crad *et al*, 2012; Avnimelech, 2007),可有效避免因大量使用抗生素带来的安全隐患。微生态制剂在水产养殖业的应用研究最早始于 1986 年,现在已被广泛用于制作有效调节水产动物肠道菌群平衡的饲料添加剂(杨艳等, 2013)。然而,微生态制剂的种类繁多,有单一菌种的微生态制剂,也有多种益

生菌组成的复合型微生态制剂,其效果不一。很多微生态制剂存在作用时间短、效果不稳定等问题,其原因在于对菌种的分类保存、生理生化特性、功能及使用方式认识不足,限制了高效微生态制剂的研制和应用。

目前,微生态制剂已越来越广泛地应用于水产养殖环境调控和养殖物种的生长促进等方面,如芽孢杆菌(*Bacillus sp.*)在水产养殖水质调控(刘卫东等, 2001; 王彦波等, 2003; 李健等, 2001)、养殖鱼类生长促进(华雪铭等, 2001)、养殖虾类肠道菌群调控(Dalmin *et al*, 2001)等方面都起到了较好的效果。植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)多在畜牧业中应用,可促进宿主对食物的消化吸收,提高宿主免疫力,降解氨等有害物质,减少环境污染等(温灿权等, 2014)。但是,微生态制剂在海水鱼类养殖方面的应用研究很少,其

* 国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50)和国家“863”计划项目(2012AA10A413)共同资助 [This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-50), and National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2012AA10A413)] 李存玉, E-mail: licunyu0814@126.com

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-12-14, 收修改稿日期: 2016-03-01

对养殖水质和养殖环境调控的相关机制尚不明了。本研究分离、纯化和鉴定出两株有益菌,并探讨了其适宜的培养条件及对水体中氨氮、亚硝酸盐、磷酸盐的降解效果,以期为开发绿色高效的海水养殖微生态制剂提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2014 年春季,在山东省日照市傅疃河入海口附近采集底泥样品,置于经灭菌处理的容积为 100 ml 的安瓿瓶中,放入冰盒内,当天返回实验室,用于细菌分离培养。

1.2 菌株分离与培养

将污泥用无菌水制成悬浮液,以 300 目筛绢网过滤,滤液 6000 r/min 离心,弃去上清液,再以无菌水制成混悬液。在超净操作台中,取 1 ml 混悬液样品,加入含 9 ml TSB 液体培养基的试管中,按 1:10 梯度制成 6 个梯度稀释液,分别取 100 μ l 均匀涂布于 TSB 固体培养基上,置于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 72 h。按照形态特征,挑取优势生长的单菌落置于 TSB 液体培养基中,28 $^{\circ}$ C 条件下培养 24 h,再分别以接种环平板划线的方式接种于 TSB 固体培养基上,28 $^{\circ}$ C 恒温培养 72 h。重复平板划线操作 3 次,直至培养基上存在单一菌落。

1.3 菌株鉴定

1.3.1 革兰氏染色与镜检 取新鲜单菌体进行革兰氏染色,步骤参照试剂盒(青岛海博生物技术有限公司)说明书。光学观察进行形态鉴别,参照《伯杰细菌鉴定手册》、《常见细菌系统鉴定手册》(布坎南等,1995;东秀珠等,2001)进行。

1.3.2 分子鉴定 利用土壤基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌总 DNA(OMEGA,美国)。扩增 16S rRNA 基因的正向引物为 27F: 5'-AGAGTTTGAT-CCTGGCTCAG-3',反向引物为 1492R: 5'-GGTTAC-CTTGTTACGACTT-3'。PCR 扩增采用 50 μ l 反应体系: 10 \times PCR Buffer 5 μ l, dNTPs 4 μ l, 正反向引物各 1 μ l, Taq 酶 0.25 μ l, 细菌裂解液 1.0 μ l, ddH₂O 37.25 μ l。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 30 个循环(95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s), 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。电泳检测、切胶回收、连接、转化后,在 LB 平板涂布,37 $^{\circ}$ C 恒温培养。挑单菌落 LB 液体培养基扩培,以通用引物 M13 进行菌液 PCR 检测,将阳性克隆送至生

工生物工程(上海)股份有限公司测序。将菌株测序结果进行 BLAST 检索,筛选同源性高的细菌 16S rRNA 基因序列,构建系统发育进化树。

1.3.3 生理生化特性分析 参照《常见细菌系统鉴定手册》方法(东秀珠等,2001),利用细菌微量生化鉴定管(青岛海博生物技术有限公司)进行生理生化鉴定。

1.4 适宜生长条件确立

根据菌种鉴定结果,在温度为 30 $^{\circ}$ C、盐度为 28 的条件下,设置 6.0、6.5、7.0 共 3 个 pH 梯度,每个梯度设置 3 个平行。分别吸取 20 μ l 分离纯化的菌液于 1 ml TSB 液体培养基中,150 r/min、30 $^{\circ}$ C 培养复苏 2 h。将复苏的菌液各 20 μ l 加入到不同 pH 的培养液中,150 r/min、30 $^{\circ}$ C 培养 48 h。每 2 h 取 50 μ l 培养液,比色皿中稀释至 1 ml,根据 OD 值绘制生长曲线,以最先进入生长平台期为基准确定最佳生长 pH。

在 pH 为 6.0、盐度为 28 的条件下,设置 30 $^{\circ}$ C、33 $^{\circ}$ C、36 $^{\circ}$ C、39 $^{\circ}$ C 共 4 个温度,每个梯度设置 3 个平行。分别吸取 20 μ l 分离纯化的菌液于 1 ml TSB 液体培养基中,150 r/min、30 $^{\circ}$ C 培养复苏 2 h。将复苏的菌液各 20 μ l 加入到不同温度的培养液中,150 r/min、30 $^{\circ}$ C 培养 48 h。每 2 h 取 50 μ l 培养液,在比色皿中稀释至 1 ml,根据 OD 值绘制生长曲线,确定最佳生长温度。

1.5 水质调控效果测试

水质调控实验分别在实验室条件和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)养殖池塘中进行,将两株益生菌(菌株 A 和菌株 B)生产性扩大培养,至相同浓度时,按 1:1 的比例混合后添加到实验组中。水质检测指标包括氨氮、亚硝酸盐和磷酸盐。氨氮的测定采取水杨酸-次氯酸盐光度法(GB7481-87)进行,亚硝酸盐测定采用重氮化偶合光度法(GB 7493-87),磷酸盐的测定采用抗坏血酸钼氨酸分光光度法(GB 11893-89),使用哈希水质分析仪(DR/890,美国)测定各参数值。

在实验室条件下,利用标准溶液制作标准曲线,以化学试剂配制不同浓度的氨氮、磷酸盐和亚硝酸盐溶液,设为实验组,起始浓度分别设置为 0.22、0.25 和 0.05 mg/L,每组 3 个重复。将一定浓度的菌株 A ($OD_{600\text{ nm}}=2.33$)和菌株 B ($OD_{600\text{ nm}}=2.23$)培养液按照 1:1 混合,添加至实验组(添加密度为 10×10^4 cell/ml),对照组不添加,每 24 h 分别测定实验组氨氮、亚硝酸盐和磷酸盐含量变化,连续监测 8 d。实验期间,各实验组实测水温为 21-23 $^{\circ}$ C。

选取 2 个泥沙底质、面积为 0.33 hm^2 且放养同等

数量牙鲈的池塘 2 口, 池塘日换水率为 50%。实验池塘按 1:1 的比例添加菌株 A 和菌株 B 的混合制剂, 添加密度为 5×10^4 – 10×10^4 cell/ml。池塘日换水率为 50%, 换水后按照初始添加量的 50% 补充添加益生菌, 维持池塘内有益菌浓度; 不添加有益菌制剂的池塘作为对照组。实验进行 10 d, 实验期间, 实验池塘和对照池塘内实测水温为 20–23℃, 每天检测、记录 2 组池塘中氨氮、磷酸盐和亚硝酸盐水平的变化。

1.6 数据分析

对 16S rRNA 基因测序结果进行在线同源序列比对(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)。使用 BioEdit 进行同源性分析, 采用 MEGA 6.0 软件 Neighbor-Joining Method 法构建系统发育进化树。利用 SPSS 21.0 统计软件对数据进行统计处理。设置差异显著性水平 P 为 0.05, 当 $P < 0.05$ 时认为差异显著, 当 $P < 0.01$ 时认为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 菌落特征

TSB 培养基初步筛选到 2 种不同形态特征的菌落。一种菌落呈圆形, 边缘完整, 中间凸起, 乳白色, 表面湿润光滑, 数量多, 标记为菌落 A。经多次挑取单菌落、划线培养, 最终得到优势明显的单一菌落 A, 半透明; 另外一种菌落呈圆形, 边缘不整齐, 菌落整体扁平, 暗黄色, 表面干燥, 菌落相对较大, 标记为菌落 B。

2.2 细菌形态特征

革兰氏染色后, 光镜(油镜)下观察菌株 A 和菌株 B 的形态特征(图 1)。菌株 A 菌体革兰氏染色阳性, 短杆状、近球形, 单个或者短链状排列(图 1-A); 菌株 B 菌体革兰氏染色阳性, 长直杆状, 成对链状排列, 可观察到卵圆形的芽孢(图 1-B)。

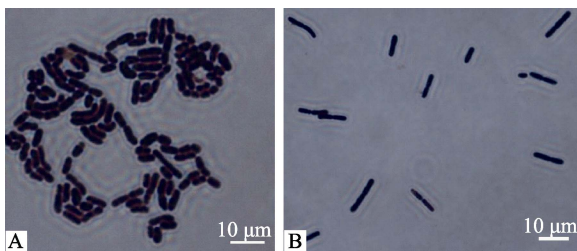


图 1 菌株 A 和菌株 B 的形态特征
Fig.1 Morphology of bacteria strain A and bacteria strain B

2.3 16S rRNA 测试与系统进化树分析

菌株 A 和菌株 B 的 16S rRNA 基因扩增产物大小分别为 1591 bp 和 1595 bp(图 2)。BLAST 同源性比对分析结果表明, 菌株 A 为植物乳杆菌, 同时, 筛选同源性高的细菌 16S rRNA 基因序列, 构建了其系统发育进化树(图 3); 菌株 B 的 16S rRNA 序列与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的新种(*Bacillus* sp. BSi20565, 登录号 EU330341.1)序列的相似度达到 99%, 鉴定其属于芽孢杆菌属与枯草芽孢杆菌相似种。

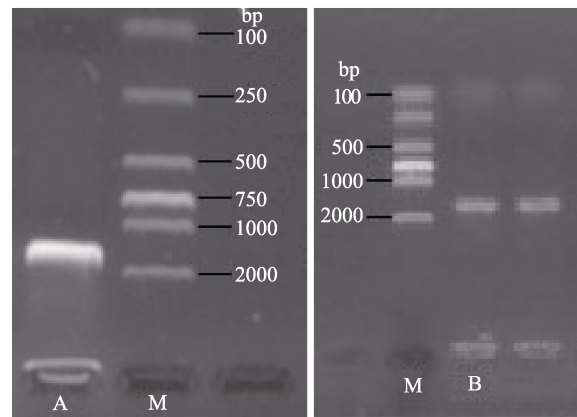


图 2 菌株 A(左)和菌株 B(右)的 DNA 琼脂糖凝胶电泳
Fig.2 Agarose gel electrophoresis of DNAs from strain A (left) and strain B (right)

2.4 生理生化特性

菌株 A 和 B 的生理生化特征分别见表 1 和表 2。根据《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等, 2001)和《伯杰氏细菌鉴定手册》(布坎南等, 1984)植物乳杆菌和芽孢杆菌属特征, 比对测试结果显示, 菌株 A 生理生化特性与植物乳杆菌一致, 菌株 B 生理生化特性与芽孢杆菌属一致, 但尚未对应到具体种。

2.5 适宜培养条件

2.5.1 植物乳杆菌(菌株 A) 在培养温度为 30℃、盐度为 28 时, 不同 pH 对植物乳杆菌生长影响差异不显著, 但在 pH=6.5 时, 植物乳杆菌生长曲线最先进入快速生长期, 达到平台期的时间最短(图 4), 表明此 pH 条件下其生长状态最好。

在培养条件设定为 pH=6.5、盐度为 28 时, 不同温度对植物乳杆菌生长影响差异不显著, 但在温度为 30℃时, 植物乳杆菌生长曲线最先进入快速生长期, 达到平台期的时间最短(图 5), 说明 30℃是植物乳杆菌生长的最适宜温度。

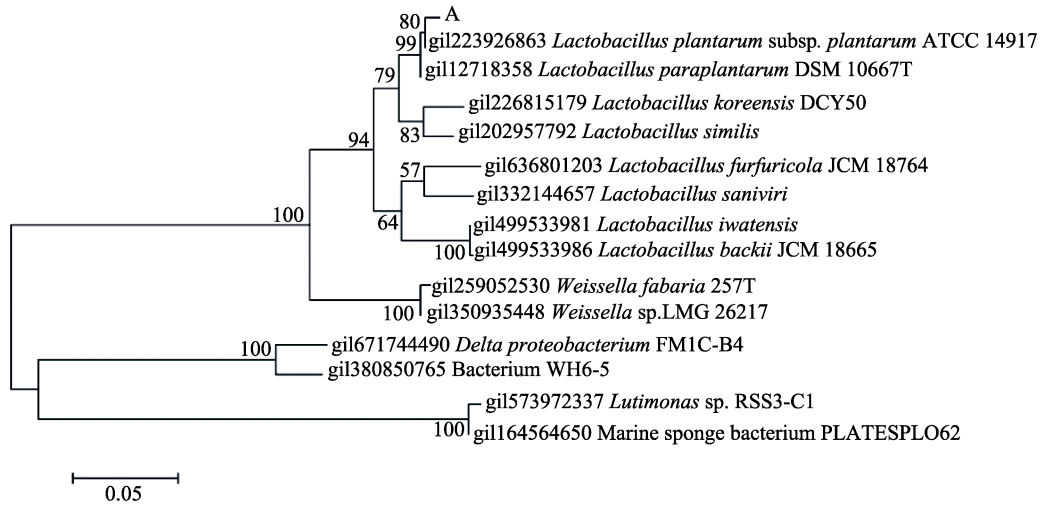


图 3 菌株 A 基于 16S rRNA 序列的系统发育进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of strain A and other bacteria based on 16S rRNA sequences

表 1 菌株 A 生理生化特性

Tab.1 Physiological and biochemical characteristics of strain A

生理生化反应 Physiological and biochemical reactions	反应特征 Reaction characteristics	生理生化反应 Physiological and biochemical reactions	反应特征 Reaction characteristics
酶触反应 Enzymatic reaction	-	麦芽糖 Malt sugar	+
氢化酶反应 Hydrogenation enzyme reaction	-	甘露醇 Mannitol	+
明胶液化 Gelatin liquidized test	-	甘露糖 Mannose	+
产 H ₂ S 试验 H ₂ S test	-	水杨苷 Salicin	+
MR 试验 MR test	-	棉籽糖 Raffinose	+
VP 试验 VP test	+	菊糖 Synanthrin	+
七叶苷 Esculin	+	山梨醇 Sorbitol	+
纤维二糖 Cellobiose	+	蔗糖 Sucrose	+
鼠李糖 Rhamnosus	-	乳糖 Lactose	+

+表示反应呈阳性, -表示反应呈阴性。下同

+: Positive reaction, -: Negative reaction. The same as below

表 2 菌株 B 生理生化特性

Tab.2 Physiological and biochemical characteristics of strain B

生理生化反应 Physiological and biochemical reactions	反应特征 Reaction characteristics	生理生化反应 Physiological and biochemical reactions	反应特征 Reaction characteristics
酶触反应 Enzymatic reaction	+	麦芽糖 Malt sugar	+
氢化酶反应 Hydrogenation enzyme reaction	-	甘露醇 Mannose	+
明胶液化 Gelatin liquidized test	+	葡萄糖产气 Glucose production	-
产 H ₂ S 试验 H ₂ S test	-	酪素 Casein	+
MR 试验 MR test	-	芽孢卵圆形 Oval spore	+
VP 试验 VR test	-	菌体呈杆状 Stalked bacterial	+
吲哚试验 Indole test	-	硝酸盐还原 Nitrate reduction reaction	+

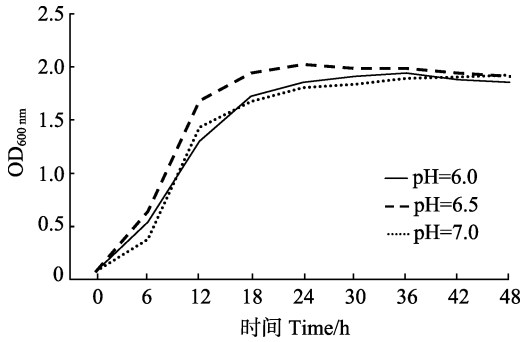


图4 不同pH下菌株A(植物乳杆菌)的生长曲线
Fig.4 Growth curve of strain A (*L. plantarum*) in different pH

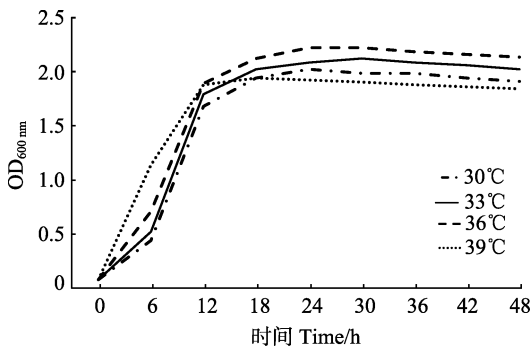


图5 不同温度下菌株A(植物乳杆菌)的生长曲线
Fig.5 Growth curve of strain A (*L. plantarum*) under different temperatures

2.5.2 芽孢杆菌(菌株B) 当培养条件设定温度为30℃、盐度为28时,不同pH对枯草芽孢杆菌(菌株B)生长的影响见图6。在pH=6.0的条件下,枯草芽孢杆菌生长曲线最先进入快速增长期,达平台期所用时间最短,说明pH=6.0时菌株B生长状态最好。

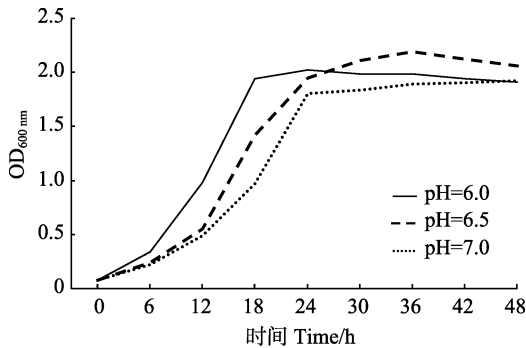


图6 不同pH下菌株B(枯草芽孢杆菌)的生长曲线
Fig.6 Growth curve of bacteria strain B (*B. subtilis*) in different pH

在pH=6.0、盐度为28的培养条件下,当温度设置为36℃时,枯草芽孢杆菌(菌株B)生长曲线最先进入快速增长期,达到平台期所用时间最短(图7),说明36℃为菌株B的最适生长温度。

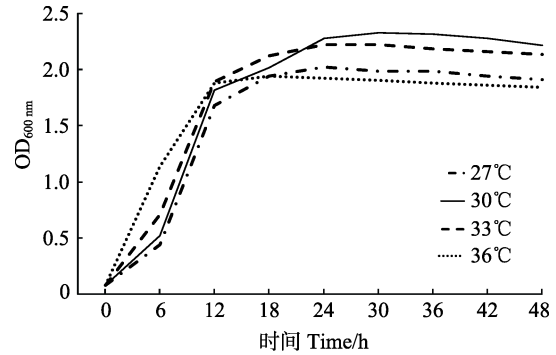


图7 不同温度下菌株B(枯草芽孢杆菌)生长曲线
Fig.7 Growth curve of bacteria strain B (*B. subtilis*) under different temperatures

2.6 水质调控实验

2.6.1 实验室条件下水质调控效果 在实验室条件下,添加益生菌后,实验组氨氮、亚硝酸盐和磷酸盐含量逐渐降低。其中,氨氮含量自第3天开始降低,至第4天氨氮含量显著下降($P<0.05$),其后维持较低水平,降解率达73.2%;实验组亚硝酸盐含量缓慢下降,第5天后基本达到稳定状态,降解率达到58.0%;实验组磷酸盐含量持续降低,至第4天后达到稳定状态,降解率达到52.4%(表3)。对照组营养盐浓度未有明显变化,未在表3中列示。

2.6.2 池塘养殖水质调控效果 添加2种益生菌混合液后,与对照池塘相比,添加益生菌的池塘水体中氨氮、亚硝酸盐和磷酸盐含量明显降低(表4)。其中,实验池塘养殖水体中氨氮含量在6d内没有明显变化,维持在0.41–0.51 mg/L之间,自第7天开始,氨氮含量明显下降,至实验结束时,氨氮降解率达86.3%;实验池塘养殖水体中磷酸盐含量自添加第4天开始显著下降,实验结束时,降解率达88.9%;实验池塘养殖水体中亚硝酸盐含量自添加后逐渐降低,最大降解率达到68.3%。

3 讨论

本研究自河口污泥中利用培养基分离纯化,获得了两株细菌,经形态观察、分子鉴定、生理生化特性分析,鉴定其中一株为植物乳杆菌,另一株菌16S rRNA序列与枯草芽孢杆菌的新种序列相似度达99%。一般认为,16S rRNA序列同源性大于99%,可以认为属于同一种(Fry *et al.*, 1991)。NCBI数据库已登录的枯草芽孢杆菌可能为新种,尚未命名,作者试图通过生理生态特性进一步确认,但仍未得到明确结果,具体种的鉴定和命名尚有待于今后进一步研究确认。

表 3 实验室条件下有益菌对水中营养盐的降解效果

Tab.3 Degrading effects of the obtained probiotics on water nutritive salts under laboratory conditions

天数 Days (d)	氨氮 Ammonia nitrogen (mg/L)	氨氮降解率 Ammonia nitrogen degradation rate (%)	亚硝酸盐 Nitrite (mg/L)	亚硝酸盐降解率 Nitrite degradation rate (%)	磷酸盐 Phosphate (mg/L)	磷酸盐 降解率 Phosphate degradation rate (%)
0	0.220	—	0.050	—	0.250	—
1	0.220	0	0.046	8.0	0.200	20.0
2	0.210	4.5	0.040	20.0	0.135	46.0
3	0.160	27.3	0.032	36.0	0.123	50.8
4	0.070	68.2	0.026	48.0	0.120	52.0
5	0.062	71.8	0.025	50.0	0.120	52.0
6	0.061	72.3	0.021	58.0	0.119	52.4
7	0.059	73.2	0.021	58.0	0.119	52.4
8	0.059	73.2	0.021	58.0	0.119	52.4

表 4 有益菌对池塘养殖水体中营养盐的降解效果

Tab.4 Degrading effects of the obtained probiotics on nutritive salts in pond water

天数 Days (d)	实验组 Experimental group					对照组 Control group			
	氨氮 Ammonia nitrogen (mg/L)	氨氮降解率 Ammonia degradation rate (%)	磷酸盐 Phosphate (mg/L)	磷酸盐降解率 Phosphate degradation rate (%)	亚硝酸盐 Nitrite (mg/L)	亚硝酸盐 降解率 Nitrite degradation rate (%)	氨氮 Ammonia nitrogen (mg/L)	磷酸盐 Phosphate (mg/L)	亚硝酸盐 Nitrite (mg/L)
1	0.51	—	0.27	—	0.060	—	0.55	0.28	0.060
2	0.47	7.8	0.26	3.7	0.066	0	0.52	0.32	0.062
3	0.42	17.6	0.23	14.8	0.056	6.7	0.47	0.36	0.058
4	0.50	1.9	0.15	44.4	0.047	2.2	0.47	0.32	0.060
5	0.48	5.9	0.10	62.9	0.038	3.6	0.46	0.21	0.051
6	0.41	19.6	0.13	51.9	0.045	25.0	0.49	0.27	0.061
7	0.35	31.4	0.07	74.1	0.041	31.7	0.50	0.23	0.050
8	0.24	52.9	0.09	66.7	0.035	41.7	0.42	0.26	0.040
9	0.17	66.7	0.05	81.5	0.021	65.0	0.47	0.29	0.042
10	0.07	86.3	0.03	88.9	0.019	68.3	0.38	0.28	0.045

无论是淡水还是海水养殖条件下, 养殖水体中氨氮、亚硝酸盐和磷酸盐等营养盐均会显著影响养殖鱼类的正常生长。芽孢杆菌在自然界中广泛存在, 具有营养简单、繁殖迅速、适应能力强、抑制病原菌生长、产生物酶等特点。目前, 芽孢杆菌已在水产养殖中应用, 对养殖水体中氨氮等营养盐物质都具有较好的降解效果(白小丽, 2013¹⁾; 邱燕, 2010²⁾; 李卫芬等, 2011; 张克强等, 2006; 郑虹等, 2005)。植物乳杆菌是乳酸菌

的一种, 是厌氧细菌(兼性好氧), 可大量产酸控制水中 pH 值稳定, 且在繁殖过程中能产出特有的乳酸杆菌素, 在食品工业乳酸发酵等领域有着广泛的应用(王水泉等, 2010)。植物乳杆菌在水产养殖水质调控中的应用研究不多, 且效果不一(齐欣等, 2007), 对海水池塘水质调控效果研究未见报道。本研究建立了这两株有益菌适宜生长的 pH 和温度条件, 为其生产性应用提供了支撑。研究表明, 将两株纯化培养的

1) Bai XL. The studies on ammonia excretions by grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) and the effect of probiotics on the water quality of mandarin fish pond. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2013, 6 [白小丽. 草鱼、鳊鱼氨氮排泄研究及微生态制剂对鳊鱼养殖池塘的影响. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2013, 6]

2) Qiu Y. Effects of three micro-ecological agents on growth performance, physiological function and intestinal mucosa of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Master's Thesis of Soochow University, 2010, 5 [邱燕. 三种微生态制剂对草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 生长性能、生理机能及肠道黏膜的影响. 苏州大学硕士研究生学位论文, 2010, 5]

菌株按照 1 : 1 的比例混合后添加,无论是在实验室条件下,还是在池塘养殖条件下,都对水中氨氮、亚硝酸盐和磷酸盐具有显著的降解效果,实验室条件下各组分的降解率达 52%以上,池塘水体中各组分的降解率达 68%以上。但是,两种实验条件下,实验组水体中营养盐含量在第 3 天后才明显降低,表明有益菌起作用时间较晚,可能与有益菌未提前进行活化有关,今后生产应用过程中应提前利用糖等优质碳源对有益菌进行活化,以提高其作用效果。

本研究发现,本次实验所使用的益生菌制剂对池塘水质调控的效果较实验室条件下的水质调控效果好,其原因可能在于池塘中所添加的益生菌与池塘养殖水体和底泥中的物质发生互作反应,同时,池塘养殖环境促进了菌株的生长和繁殖,增加了其密度,从而提高了其对污染物质的降解效果,具体的原因和机制尚有待于深入开展养殖环境微生物群落变化规律研究来确定。另外,本研究将两株菌 1 : 1 比例混合后应用,对于哪个菌株发挥关键调控作用尚未明确,今后应开展单菌株对水中营养盐的降解实验,明确两株有益菌各自的水质调控效果。

参 考 文 献

- Avnimelech Y. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture*, 2007, 264(1): 140–147
- Buchanan RE, Gibbons NE. *Berger's bacterial identification manual* (Version 8). Beijing: Science Press, 1984, 729–758 [布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰氏细菌鉴定手册. 第 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 729–758]
- Crad R, Defoirdt T. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, 2012, 356–357(4): 351–356
- Dalmin G, Kathiresan K, Purushothaman A. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2001, 39(9): 939–942
- Dong XZ, Cai MY. *Chang Jian Xi Jun Xi Tong Jian Ding Shou Ce*. Beijing: Science Press, 2001 [东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001]
- Fry NK, Warwick S, Saunders NA, *et al.* The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family legionellaceae. *Journal of General Microbiology*, 1991, 137(5): 1215–1222
- Hua XM, Zhou HQ, Qiu XZ, *et al.* Effects of dietary *Bacillus* sp. and selenoenzyme on the growth and disease resistance of allogynogenetic crucian carp. *Journal of Fisheries of China*, 2001, 25(5): 448–453 [华雪铭, 周洪琪, 邱小踪, 等. 饲料中添加芽孢杆菌和硒酵母对异育银鲫的生长及抗病力的影响. *水产学报*, 2001, 25(5): 448–453]
- Li J, Sun XT, Wang Q, *et al.* Studies on the effects of probiotics in Crustacean's farming. *Marine Fisheries Research*, 2001, 22(2): 26–31 [李健, 孙修涛, 王群, 等. 微生态制剂在甲壳动物养殖中的应用研究. *海洋水产研究*, 2001, 22(2): 26–31]
- Li WF, Zhang XP, Song WH, *et al.* Application of *Bacillus* to water quality control in grass carp culture. *Fisheries Modernization*, 2011, 38(4): 22–26 [李卫芬, 张小平, 宋文辉, 等. 芽孢杆菌对草鱼养殖水质调控作用的研究. *渔业现代化*, 2011, 38(4): 22–26]
- Liu WD, Su H, Deng LK. Applications of microorganisms in aquaculture. *Fisheries Science*, 2001, 20(2): 28–31 [刘卫东, 苏浩, 邓立康. 微生物在水产养殖中的应用. *水产科学*, 2001, 20(2): 28–31]
- Qi X, Wei XS, Chen Y, *et al.* Effect of probiotics on growth performance of *Carassius auratus* var Pengze and water quality. *Chinese Feed*, 2007(17): 27–29 [齐欣, 魏雪生, 陈颖, 等. 益生菌对彭泽鲫生长性能及水体环境的影响. *中国饲料*, 2007(17): 27–29]
- Torrecillas S, Makol A, Cabaliero MJ, *et al.* Immunostimulations and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 23(5): 969–981
- Wang SQ, Bao Y, Dong XM, *et al.* Physiological function and application of *Lactobacillus planetarium*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2010, 12(4): 49–55 [王水泉, 包艳, 董喜梅, 等. 植物乳杆菌的生理功能及应用. *中国农业科技导报*, 2010, 12(4): 49–55]
- Wang YB, Deng YS. Study on the effect of probiotics on pond water quality. *Water Conservancy and Fisheries*, 2003, 23(2): 16–17 [王彦波, 邓岳松. 微生态制剂对虾池水质影响的研究. *水利渔业*, 2003, 23(2): 16–17]
- Wen CQ, Dai JJ, Huang MD, *et al.* Isolation, identification and growth characteristics of a strain of *Lactobacillus planetarium*. *Fujian Journal of Animal Husbandry and Veterinary medicine*, 2014, 36(3): 18–23 [温灿权, 戴佳佳, 黄梅丹, 等. 一株植物乳杆菌的分离鉴定及其生长特性研究. *福建畜牧兽医*, 2014, 36(3): 18–23]
- Yang Y, Pan BH, Sun XF. Function of *Lactobacillus planetarium* and its application in animal production. *Feed Research*, 2013(2): 36–37 [杨艳, 潘宝海, 孙笑非. 植物乳杆菌的功能及其在动物生产中的应用. *饲料研究*, 2013(2): 36–37]
- Zhang KQ, Li Y, Li JX. Application of the compound microbiological preparation in fish pond. *Marine Sciences*, 2006, 30(9): 88–91 [张克强, 李野, 李军幸. 芽孢杆菌菌剂在水产养殖中的应用初探. *海洋科学*, 2006, 30(9): 88–91]
- Zheng H, Shi QQ, Shi BH, *et al.* Comparison of *Bacillus* sp. on depuration of aquaculture water-body. *Journal of Microbiology*, 2005, 25(6): 41–44 [郑虹, 施巧琴, 施碧红, 等. 芽孢杆菌对比养殖水体净化作用的比较研究. *微生物学杂志*, 2005, 25(6): 41–44]

Isolation, Culture, and Identification of Two Strains of Probiotics and Their Effects on Water Quality Control

LI Cunyu^{1,3}, LIU Xuezhou^{1,2①}, XU Yongjiang^{1,2}, SHI Bao^{1,2}, ZHENG Wei⁴, SHI Xueying^{1,3}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 4. Ecological Environment Institute of Rizhao, Rizhao 276805)

Abstract Good water quality is essential for the healthy growth of pond-cultured marine fish. Balanced microecological environment plays an important role in the maintenance of water quality and control of fish disease. To identify the mechanisms regulating the balance in microecological environment and to find specific and high-efficiency probiotics for pond culture of marine fish, here we tested two strains of bacteria isolated from sewage sludge of the estuary area of the Futuan River in Rizhao. They were identified as *Lactobacillus plantarum* and a *Bacillus subtilis*-like species according to the analysis such as morphological characteristics, biochemical properties, and 16S rRNA sequencing. The optimum growth conditions for *L. plantarum* and *B. subtilis* were pH 6.5/temperature 30°C and pH 6.0/temperature 36°C respectively. In the laboratory, the degrading effects of the mixed bacteria strains A and B (1:1) on ammonia nitrogen, nitrite, and phosphate in the seawater were 73.2%, 58.0%, and 52.4% respectively. Next, we examined the degrading effects of the bacteria in two outdoor marine ponds rearing Japanese flounder. One was designated as the experimental pond added with the probiotics (mixture of strain A and strain B), and the other one was the control. The applications of the probiotics (1:1, bacteria density 5×10^4 – 10×10^4 cell/ml) caused significant decrease in the concentrations of ammonia nitrogen, nitrite, and phosphate, and the degrading rates were 86.3%, 88.9%, and 68.3% respectively. Our results provided useful information for large-scale production of the two probiotics and for their application in aquaculture in the future.

Key words *Lactobacillus plantarum*; *Bacillus subtilis*, Bacterial identification; Water quality control

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

黄条鲮(*Seriola aureovittata*)肌肉营养 组成分析与评价*



柳学周^{1,2①} 徐永江^{1,2} 李 荣³ 吕永军³
史 宝^{1,2} 宁劲松^{1,2} 王 滨^{1,2}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与
食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 大连富谷水产有限公司 大连 116400)

摘要 为进一步认识和评价黄条鲮(*Seriola aureovittata*)的营养与食用价值,本研究测定了其肌肉中的水分、蛋白质、粗脂肪、灰分、氨基酸、脂肪酸和矿物质等成分,并对其养殖及野生个体的肌肉营养成分组成进行了比较分析。结果显示,黄条鲮肌肉中蛋白质含量较高,必需氨基酸和鲜味氨基酸含量丰富,完全符合 FAO/WHO 推荐的理想蛋白质标准,是一种优质蛋白供给源。根据 AAS 和 CS 分值,黄条鲮肌肉的第一限制氨基酸为蛋氨酸,第二限制氨基酸为缬氨酸。黄条鲮肌肉的脂肪含量高于三文鱼(*Salmo salar*)、金枪鱼(*Thunnus thynnus*)、石斑鱼(*Epinephelus* sp.)等,且肌肉中含有丰富的不饱和脂肪酸,不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸比值较高,特别是 EPA+DHA 的含量高,具有较优的口感鲜度和较高的营养价值。另外,黄条鲮肌肉中含有多种机体新陈代谢所需的矿物质,经常食用可促进人体新陈代谢水平。比较发现,养殖黄条鲮较野生黄条鲮具有相对较高的脂肪含量和较低的水分含量,比能值(EP)分别为 13.44 kJ/g 和 8.68 kJ/g,其他营养成分无显著差异,表明养殖与野生黄条鲮肌肉营养价值相似。综上所述,黄条鲮肌肉蛋白质和脂肪质量较高,口感鲜美,营养成分丰富,是一种值得大力开发养殖的海产经济鱼类。

关键词 黄条鲮; 肌肉; 营养成分; 营养评价

中图分类号 TS201.4; S917.4; R151.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0128-08

黄条鲮(*Seriola aureovittata*)属鲈形目(Perciformes)、鲈科(Carangidae)、鲮属(*Seriola*),又称黄尾鲮、拉氏鲮,俗称黄辘牛、黄辘子,是一种全球性分布的海洋中上层暖温性远洋洄游鱼类,也是一种经济价值很高的食用鱼类。世界范围内鲮属鱼类共有 9 种,其中,黄条鲮在我国黄渤海、东海、南海,朝鲜半岛、日本,非洲南部,澳大利亚,美国,印度,南非海域及印度洋,均有分布,根据地域性差异可分为 3 个形态相似

的地理亚种:亚洲种群、加利福尼亚种群和南部(南非-澳洲)种群(刘静等, 2015)。

黄条鲮生长速度快、个体大,适合于深水抗风浪网箱和陆基工厂化养殖,是我国发展深远海鱼类养殖的优良品种。其肉味鲜美,适合生吃、煎、烤等多种烹饪方式,其生鱼片产品品质可与金枪鱼(*Thunnus thynnus*)、三文鱼(*Salmo salar*)媲美,深受广大消费者喜爱,世界范围内消费需求不断增加。目前,澳大利

* 青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划专项项目(2015ASKJ02-03)、中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2016PT07)和国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50)共同资助 [This work was supported by Aoshan S&T Innovation Project from Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2015ASKJ02-03), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, Chinese Academy of Fishery Sciences (No.2016PT07), and China Agriculture Research System (CARS-50)] 柳学周, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-07-22, 收修改稿日期: 2016-09-03

亚、新西兰、日本等国家已陆续开展了黄条鲷的人工繁育和养殖技术开发(Moran *et al*, 2007、2011; Shiraiishi *et al*, 2010; Chen *et al*, 2006), 但养殖产量远无法满足市场消费需求。近年来, 我国相关单位开展了黄条鲷的人工养殖实验, 但由于对其生活习性、繁殖与洄游特性及营养特征等缺乏认识, 相关研究进展较慢。为了准确评价黄条鲷的营养价值, 推动养殖业发展, 本研究测定了我国黄海海域自然分布的黄条鲷的肌肉营养成分, 并对养殖和野生黄条鲷肌肉营养成分进行了比较分析, 旨在为评价该鱼的营养品质和养殖开发潜力提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 实验鱼

人工养殖黄条鲷取自大连富谷水产有限公司海上网箱养殖基地, 共 3 尾, 体长为 70–80 cm, 体重为 5.1–5.9 kg; 野生黄条鲷捕获于黄海海域青岛近岸区域, 共 3 尾, 体长为 92–105 cm, 体重为 8.6–10.4 kg。

1.2 营养成分测定方法

黄条鲷经 MS-222 麻醉后测量体重、体长, 然后断头处死。取实验鱼不同部位的肌肉组织, 去皮后切成 2–3 cm 片状, 3 尾鱼肌肉组织等比例混合后重量为 500–1000 g, 快速在–40℃条件下冷冻保存, 备用。肌肉组织样品送国家水产品质量检验检测中心进行测试, 每个样品测试 2 次。

水分含量采用直接干燥法测定(GB 5009.3-2010); 粗蛋白含量使用全自动凯氏定氮仪(GB 5009.5-2010)测定; 粗脂肪含量测定: 肌肉以盐酸水解后采用索氏法提取, 全自动脂肪测定仪(GB/T 5009.6-2003)测定; 灰分含量利用高温灰化法测定(GB 5009.4-2010)。

氨基酸含量测定: 酸水解法处理肌肉, 使用日本日立公司 L-8800 全自动氨基酸自动分析仪(GB/T 5009.124-2003)测定。

脂肪酸含量测定: 水解提取肌肉中脂肪酸, 使用美国安捷伦公司 7890A 气相色谱仪(GB/T 22223-2008)测定。

矿物质包括常量元素(K、P、Mg、Na、Ca)和微量元素(Fe、Cu、Zn、Mn、Cr)两类, 其在肌肉中的含量采用 ZJB302 等离子体发射光谱法测定。

1.3 比能值计算方法

比能值 Q (kJ/g) = $\omega_1 \times 23.64 + \omega_2 \times 39.54 + \omega_3 \times 17.15$

式中, ω_1 – ω_3 分别为蛋白质、脂肪和总糖的百分含量, 蛋白质、脂肪和总糖的比能值分别为 23.64 kJ/g、

39.54 kJ/g 和 17.15 kJ/g。

总糖含量(%) = $[100 - (\text{粗蛋白} + \text{粗脂肪} + \text{灰分} + \text{水分})] / 100$ (刘长琳等, 2015)。

EP 值为比能值与蛋白含量的比值。

1.4 肌肉营养价值评价方法

根据 FAO/WHO 建议的氨基酸评分标准模式和中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所提出的全鸡蛋蛋白质的氨基酸模式, 计算黄条鲷氨基酸评分(AAS)和化学评分(CS)(尤宏争等, 2014; 张升利等, 2013)。

1.5 数据分析

本研究中, 两组实验鱼各营养成分的数值为每组混合肌肉样品重复测试获得数据的平均值, 采用 Excel 2013 软件处理实验数据。

2 结果

2.1 肌肉基本营养成分组成

养殖和野生黄条鲷肌肉中都有较高的蛋白质含量, 分别为 20.30% 和 21.90%。此外, 二者灰分含量相同, 而野生黄条鲷肌肉水分含量(68.10%)高于养殖黄条鲷(56.10%), 但肌肉粗脂肪含量(8.80%)远低于养殖黄条鲷(21.40%)。养殖黄条鲷肌肉的比能值为 13.44, 而野生黄条鲷仅为 8.68(表 1)。

表 1 养殖和野生黄条鲷肌肉基本营养成分组成(湿重)

Tab.1 The proximate composition of the nutrition in the muscle of farmed and wild *S. aureovittata* (Wet weight)

营养成分 Nutritional components	养殖黄条鲷 Farmed <i>S. aureovittata</i>	野生黄条鲷 Wild <i>S. aureovittata</i>
水分 Moisture (%)	56.10	68.10
粗蛋白 Crude protein (%)	20.30	21.90
粗脂肪 Crude fat (%)	21.40	8.80
灰分 Ash (%)	1.10	1.10
总糖 Total sugar (%)	1.10	0.10
比能值 Q (kJ/g)	13.44	8.68
EP (%)	66.21	39.64

2.2 氨基酸含量分析

人工养殖黄条鲷和野生黄条鲷肌肉中氨基酸的测定结果见表 2。黄条鲷肌肉中共检测出 16 种常见氨基酸, 包括 7 种必需氨基酸、2 种半必需氨基酸和 7 种非必需氨基酸。养殖黄条鲷和野生黄条鲷肌肉中, 7 种必需氨基酸含量最高的为赖氨酸(1.79%、1.96%), 其次为亮氨酸(1.65%、1.82%); 7 种非必需氨基酸含

量最高的为丙氨酸(1.68%、1.89%),其次为天门冬氨酸(1.65%、1.82%)。其中,肌肉中可检出的氨基酸中有4种鲜味氨基酸,分别为天门冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸和丙氨酸,在养殖和野生黄条鲮肌肉中的总含量分别为5.75%和6.41%,分别占氨基酸总量的32.20%和

32.50%。

根据蛋白质评价标准,将黄条鲮肌肉中必需氨基酸含量转换为每克氮中含氨基酸毫克数(mg/g N),计算出肌肉各个必需氨基酸的AAS和CS分值(表3)。根据AAS和CS的分值,发现黄条鲮的第一限制氨

表2 养殖和野生黄条鲮肌肉氨基酸组成及含量(%、湿重)

Tab.2 The composition and contents of amino acids in the muscle of farmed and wild *S. aureovittata* (% , wet weight)

氨基酸 Amino acids	养殖黄条鲮 Farmed <i>S. aureovittata</i>	野生黄条鲮 Wild <i>S. aureovittata</i>
*苏氨酸 Thr	0.78	0.87
*缬氨酸 Val	0.96	1.07
*蛋氨酸 Met	0.60	0.66
*异亮氨酸 Ile	0.90	0.98
*亮氨酸 Leu	1.65	1.82
*苯丙氨酸 Phe	0.84	0.93
*赖氨酸 Lys	1.79	1.96
#天门冬氨酸 Asp	1.65	1.82
#谷氨酸 Glu	1.33	1.47
#甘氨酸 Gly	1.09	1.23
#丙氨酸 Ala	1.68	1.89
酪氨酸 Tyr	0.62	0.70
脯氨酸 Pro	0.51	0.55
丝氨酸 Ser	1.07	1.18
&组氨酸 His	1.18	1.28
&精氨酸 Arg	1.18	1.30
必需氨基酸 Essential amino acids (EAA)	7.52	8.29
非必需氨基酸 Nonessential amino acids (NEAA)	7.95	8.84
半必需氨基酸 Semi-essential amino acids (SEAA)	2.36	2.58
鲜味氨基酸 Delicious amino acids (DAA)	5.75	6.41
总氨基酸 Total amino acids (TAA)	17.83	19.71
W_{EAA}/W_{TAA}	42.20	42.10
W_{EAA}/W_{NEAA}	94.60	93.80
W_{DAA}/W_{TAA}	32.20	32.50

*为必需氨基酸, &为半必需氨基酸, #为鲜味氨基酸

*. Essential amino acid (EAA); &. Semi-essential amino acid (SEAA); #. Delicious amino acid (DAA)

表3 黄条鲮肌肉中必需氨基酸含量与评价

Tab.3 Evaluation of the content of the essential amino acids in the muscle of farmed and wild *S. aureovittata* (mg/g N)

必需氨基酸 Essential Amino Acids	黄条鲮 <i>S. aureovittata</i>		FAO/WHO 标准 FAO/WHO standard	鸡蛋蛋白标准 Egg protein standard	AAS		CS	
	养殖 Farmed	野生 Wild			养殖 Farmed	野生 Wild	养殖 Farmed	野生 Wild
苏氨酸 Thr	243	248	250	292	0.97	0.99	0.83	0.85
缬氨酸 Val	300	305	310	441	0.96	0.99	0.68	0.69
蛋氨酸 Met	187	188	220	386	0.85	0.86	0.49	0.49
异亮氨酸 Ile	281	280	250	331	1.12	1.12	0.85	0.84
亮氨酸 Leu	515	519	440	534	1.17	1.18	0.96	0.97
苯丙氨酸+酪氨酸 Phe+Tyr	456	465	380	565	1.19	1.22	0.81	0.82
赖氨酸 Lys	559	559	340	441	1.64	1.65	1.27	1.27
合计 Total	2540	2566	2250	3089				

基酸为蛋氨酸, 第二限制氨基酸为缬氨酸。

2.3 脂肪酸含量分析

养殖黄条鲷和野生黄条鲷肌肉分别检测出 15 种和 16 种脂肪酸, 其中包括 5 种饱和脂肪酸、4 种单不饱和脂肪酸、6 种多不饱和脂肪酸; 而野生黄条鲷肌肉中较养殖黄条鲷多检出 1 种多不饱和脂肪酸。比较得知, 养殖黄条鲷肌肉饱和脂肪酸含量(30.8%)和单不饱和脂肪酸含量(32.71%)均低于野生黄条

鲷(32.77%、34.33%), 但其多不饱和脂肪酸含量相似。鲜样中, 养殖与野生黄条鲷肌肉 EPA 与 DHA 含量之和相近, 分别为 20.23%与 20.77%, 其中, 养殖鱼肌肉 EPA 含量略高于野生鱼(6.60%、4.10%), 而 DHA 含量略低于野生鱼(13.63%、16.67%)(表 4)。

2.4 矿物质含量分析

本研究发现, 养殖黄条鲷和野生黄条鲷肌肉均含有丰富的矿物质(表 5)。其中, 常量元素中 K 的含量

表 4 养殖和野生黄条鲷肌肉脂肪酸组成比较(% , 湿重)

Tab.4 Comparison of the fatty acid composition in the muscle of farmed and wild *S. aureovittata* (% , wet weight)

脂肪酸 Fatty acids	养殖黄条鲷 Farmed <i>S. aureovittata</i>	野生黄条鲷 Wild <i>S. aureovittata</i>
*C14:0	2.88	2.51
*C15:0	0.42	0.50
*C16:0	22.25	21.23
*C17:0	0.43	0.84
*C18:0	4.82	7.69
&C16:1	6.58	5.52
&C17:1	0.34	0.53
&C18:1	22.15	27.82
&C22:1n9	3.64	0.46
#C18:2n6	1.61	0.84
#C18:3n3	1.00	0.48
#C18:4n3	2.21	0.54
#C20:4n6	-	1.32
#C22:5n3	1.09	2.10
#EPA	6.60	4.10
#DHA	13.63	16.67
饱和脂肪酸 Saturated fatty acid (SFA)	30.80	32.77
单不饱和脂肪酸 Monounsaturated fatty acid (MUFA)	32.71	34.33
多不饱和脂肪酸 Polyunsaturated fatty acid (PUFA)	26.14	26.05
UFA/SFA	1.91	1.84

*为饱和脂肪酸; &为单不饱和脂肪酸; #为多不饱和脂肪酸; -表示低于检出限

*. Saturated fatty acid (SFA); &. Monounsaturated fatty acid (MUFA); #. Polyunsaturated fatty acid (PUFA); -. Undetectable

表 5 养殖和野生黄条鲷肌肉矿物质含量的比较(mg/kg, 湿重)

Tab.5 Comparison of the contents of minerals in the muscle of farmed and wild *S. aureovittata* (mg/kg, wet weight)

矿物元素 Mineral elements (mg/kg)	养殖黄条鲷 Farmed <i>S. aureovittata</i>	野生黄条鲷 Wild <i>S. aureovittata</i>
钾 K	1810.00	1950.00
钠 Na	241.00	534.00
钙 Ca	96.00	125.00
镁 Mg	268.00	307.00
磷 P	918.00	1010.00
铜 Cu	< 0.50	< 0.50
锌 Zn	< 0.50	< 0.50
铁 Fe	5.19	4.50
锰 Mn	< 0.10	< 0.10
铬 Cr	< 0.50	< 0.50

最高,其次为 P、Mg、Na、Ca,野生黄条鲮肌肉中常量元素含量均稍高于养殖个体。微量元素中,肌肉中 Fe 含量最高,养殖黄条鲮(5.19 mg/kg)高于野生黄条鲮(4.50 mg/kg)。其他微量元素 Cu、Zn、Mn、Cr 含量相对较低(表 5)。

3 讨论

本研究采用国家标准方法分析了养殖及野生黄条鲮肌肉中的水分、蛋白质、粗脂肪、灰分、氨基酸、脂肪酸、矿物质等营养成分,研究结果为评价黄条鲮的营养品质、养殖开发利用潜力提供了科学依据。

3.1 肌肉基本营养组分评价

在营养学上,食品中的干物质含量越高,其总营养成分含量就越高。鱼肉中蛋白质和脂肪含量的多少是评价其营养价值的一项重要指标。养殖和野生黄条鲮肌肉中的粗蛋白含量分别为 20.30%和 21.90%,蛋白质含量均高于三文鱼(邓林等, 2012)、珍珠龙胆石斑鱼(♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *Epinephelus lanceolatus*)(王际英等, 2015)、鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)(黎祖福等, 2008)、棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*)(郭永军等, 2009)、七带石斑鱼(*Epinephelus septemfasciatus*)(程波等, 2009)等其他经济鱼类。另外,还发现,无论是养殖还是野生黄条鲮,其肌肉中的粗脂肪含量较高(21.40%和 8.80%),明显高于石斑鱼、三文鱼(7.38%)(孙中武等, 2004)、金枪鱼(0.98%)(王际英等, 2015; 杨金生等, 2013)等其他海水经济鱼类,而与秋刀鱼(*Cololabis saira*)肌肉脂肪含量(21.04%)相似(叶彬清等, 2014)。鱼类肌肉脂肪含量达到 3.5%—4.5%时,鱼肉才有较好的适口性(叶彬清等, 2014; 刘世禄等, 2002),黄条鲮肌肉脂肪含量高于三文鱼、金枪鱼等的肌肉脂肪含量,因此,在肉质的口感方面具有优势。另外,本研究发现,养殖黄条鲮肌肉脂肪含量远高于野生黄条鲮,可能是因为野生鱼类食性范围广,活动空间广阔,而本研究养殖的黄条鲮投喂富含脂质物质的鲜杂鱼饵料,而其人工养殖条件下活动空间相对小和能量消耗少,脂肪快速大量积累,导致肌肉脂肪含量高,这与其他鱼类的研究结果类似(Johnston *et al.*, 2006)。鱼类肌肉比能值的大小主要取决于肌肉脂类含量的高低,黄条鲮肌肉脂肪含量较高,其比能值高于其他海水鱼类。综上所述,黄条鲮是一种蛋白质和脂肪含量十分丰富的海水经济鱼类。

3.2 氨基酸组成评价

蛋白质营养评价对于优质蛋白质资源开发和居

民膳食指导具有重要的意义,体现在蛋白质满足机体氮源和氨基酸需求等方面,其评价方法多侧重于其含量和其中氨基酸的含量与比例。本研究中,养殖和野生黄条鲮肌肉中含量最高的必需氨基酸均为赖氨酸,其次为亮氨酸。赖氨酸是一种碱性必需氨基酸,它最重要的生理功能是能够参与体蛋白的合成,被称为“生长性氨基酸”。亮氨酸是一种支链氨基酸,哺乳动物自身不能合成,必须由日粮提供,亮氨酸可以起到氧化供能、促进蛋白质合成和提高免疫功能的作用(王彬等, 2012)。可见,黄条鲮肌肉富含赖氨酸和亮氨酸等必需氨基酸,是优质的人体氨基酸补充源。

动物肉质的鲜美程度取决于其蛋白质中鲜味氨基酸的组成与含量,鲜味氨基酸占氨基酸总量的比例越大,味道也就越鲜美(胡园等, 2015)。其中,谷氨酸和天门冬氨酸为呈鲜味的特征性氨基酸,而丙氨酸和甘氨酸为呈甘味的特征性氨基酸(武彦文等, 2001)。养殖和野生黄条鲮肌肉中的鲜味氨基酸占氨基酸总量的 32.2%和 32.5%,说明养殖与野生黄条鲮肌肉口感品质没有显著差异。已有研究表明,三文鱼和蓝鳍金枪鱼肌肉中的鲜味氨基酸占总氨基酸含量的比例分别为 35.60%和 35.3%(邓林等, 2012; 杨金生等, 2013),与黄条鲮肌肉中鲜味氨基酸含量占总氨基酸含量比相近,因此,这 3 种鱼类肉质的口感鲜美度相似。众所周知,胶原蛋白具有美白养颜、减少皱纹的美容功效,而脯氨酸主要存在于胶原蛋白中,其与羟脯氨酸是胶原蛋白合成的必要氨基酸种类(蒋挺大, 2006)。本研究表明,黄条鲮肌肉中含有丰富的脯氨酸,与三文鱼、蓝鳍金枪鱼、石斑鱼等相似(邓林等, 2012; 张金生等, 2013; 尤宏争等, 2014),因此,经常食用黄条鲮,可以增强人体胶原蛋白合成的能力,起到美容养颜的功效。

根据 FAO/WHO 推荐的理想蛋白质模式,质量较好的蛋白质中必需氨基酸占总氨基酸的比值(W_{EAA}/W_{TAA})在 40%左右,必需氨基酸与非必需氨基酸的比值(W_{EAA}/W_{NEAA})在 60%以上(曹静等, 2015)。本研究发现,养殖和野生黄条鲮肌肉中必需氨基酸均占总氨基酸的 42%以上,而必需氨基酸与非必需氨基酸比值高达 93%以上,同时,养殖和野生黄条鲮必需氨基酸总量分别达到 2315 mg/g N 和 2366 mg/g N,高于 FAO/WHO 标准的 2250 mg/g N,符合人类理想的优质蛋白质标准。综上所述,黄条鲮是一种味道鲜美、蛋白质量较高的优质海水鱼类。

3.3 脂肪酸组成评价

脂肪酸是细胞的重要组成成分之一,为人体提供

必不可少的营养支撑。单不饱和脂肪酸具有降血糖、血脂, 调节胆固醇的功能(王伟等, 2005), 多不饱和脂肪酸除能调节人体脂质代谢和血液粘稠度外, 还能调节心脏功能、增强人体防御系统的功能等(王萍等, 2008)。本研究发现, 养殖和野生黄条鲷肌肉中单不饱和脂肪酸的含量分别为 32.71% 和 34.33%, 高于珍珠龙胆石斑鱼(王际英等, 2015)、棕点石斑鱼(郭永军等, 2009)等, 而多不饱和脂肪酸含量(养殖 26.14% 和野生 26.05%) 稍低于珍珠龙胆石斑鱼(30.95%)(王际英等, 2015)、七带石斑鱼(32.45%)(程波等, 2009)、棕点石斑鱼(36.19%)(郭永军等, 2009)。黄条鲷肌肉中脂肪酸含量为单不饱和脂肪酸>饱和脂肪酸>多不饱和脂肪酸, 这与日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)肌肉中脂肪酸组成序列是一致的(胡园等, 2015)。鱼类脂肪的质量主要取决于脂肪酸的不饱和度, 黄条鲷肌肉中不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸比值分别为 1.91 和 1.84, 高于裸盖鱼(*Anoplopoma fimbria*)(刘长琳等, 2015)、石斑鱼(王远红等, 2006)等鱼类, 表明其脂肪质量较高。

必需脂肪酸是指机体的正常机能所需要的, 然而自身不能合成而只能从食物中获得以满足其正常生长、发育以及维持细胞组织功能所必需的高不饱和脂肪酸(胡园等, 2015)。亚油酸(C18:2n6)和亚麻酸(C18:3n3)是人体必需脂肪酸, 它们的含量和比例也是评价脂肪酸营养价值的重要指标。亚油酸是一种功能性多不饱和脂肪酸, 它能够降低血清胆固醇水平、抑制动脉血栓形成、参与脂肪分解与新陈代谢以及促进骨组织的代谢等作用(张春娥等, 2010)。 α -亚麻酸在人体内可生成 DHA 和 EPA, 具有调节血脂、预防心脑血管疾病、增强免疫力、保护视力、提高记忆力、抗氧化和延缓衰老等生理功能(杨静等, 2011)。养殖黄条鲷肌肉亚油酸和亚麻酸含量约为野生黄条鲷的 2 倍, 可能与人工养殖过程中长期强化投喂富含亚油酸和亚麻酸的鲜杂鱼饲料有关。EPA 和 DHA 是人体生长发育必需的多不饱和脂肪酸, 尤其是促进婴儿脑细胞生长和发育方面具有重要作用(Rapoport *et al.*, 2007)。黄条鲷 EPA 与 DHA 含量高于三文鱼(江建军等, 2011), 而与七带石斑鱼等(程波等, 2009)含量相近, 属于 EPA 和 DHA 含量较为丰富的鱼类。

3.4 矿物质成分评价

矿物质元素(包括常量元素和微量元素)与人体健康密切相关, 参与人体新陈代谢、各种生物和化学反应等, 维持机体渗透压、酸碱平衡。黄条鲷肌肉中含有丰富的常量元素(K、Na、Ca、Mg、P)以及微量元素(Fe)。对人体而言, 较高的 K、Na 和 P 等矿物质

含量有利于提高机体活力, 维持机体的电解质平衡, 提升新陈代谢水平。Fe 是人体必需的微量元素, 不仅参与体内氧的转运、交换和组织呼吸过程, 维持机体正常造血功能, 还直接参与人体能量代谢(徐素萍, 2007)。本研究发现, 黄条鲷肌肉中含有较高的矿物质成分, 经常摄食黄条鲷可促进机体对矿物质的吸收, 有利于提升人体新陈代谢水平和造血功能。

4 结论

研究表明, 黄条鲷肌肉中蛋白质含量较高, 氨基酸种类齐全, 必需氨基酸和鲜味氨基酸含量丰富, 是一种高质量的蛋白来源。根据 AAS 和 CS 分值, 黄条鲷肌肉的第一和第二限制氨基酸分别为蛋氨酸和缬氨酸。另外, 黄条鲷肌肉脂肪含量高, 含有丰富的不饱和脂肪酸, 不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸比值较高, 特别是 EPA+DHA 含量高, 口感鲜度和营养价值俱佳, 是一种味道鲜美和具有高营养价值的海产鱼类。养殖与野生黄条鲷肌肉比能值分别为 13.44 kJ/g 和 8.68 kJ/g, 其他营养成分无显著差异, 表明肌肉营养价值相似。针对目前黄条鲷自然资源衰减, 国内外市场需求强烈的现状, 今后应加快开展黄条鲷人工繁育和增养殖技术研发, 推动养殖产业发展, 为大众提供优质美味的大洋性鱼类产品。

参 考 文 献

- Cao J, Zhang FP, Song J, *et al.* Comparative analysis of nutrient composition of muscles of farmed and wild *Leiocassis longirostris*. *Food Sciences*, 2015, 36(2): 126–131 [曹静, 张凤桦, 宋军, 等. 养殖和野生长吻鲷肌肉营养成分比较分析. *食品科学*, 2015, 36(2): 126–131]
- Chen BN, Qin JG, Kumar MS, *et al.* Ontogenetic development of the digestive system in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture*, 2006, 256(1–4): 489–501
- Cheng B, Chen C, Wang YG, *et al.* Nutritional components analysis and nutritive value evaluation in *Epinephelus septemfasciatus* muscles. *Progress in Fisheries Science*, 2009, 30(5): 51–57 [程波, 陈超, 王印庚, 等. 七带石斑鱼肌肉营养成分分析与品质评价. *渔业科学进展*, 2009, 30(5): 51–57]
- Deng L, Li H, Jiang JJ. Nutrition evaluation of Norway salmon. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(8): 377–379 [邓林, 李华, 江建军. 挪威三文鱼的营养评价. *食品工业科技*, 2012, 33(8): 377–379]
- Guo YJ, Xing KZ, Xu DW, *et al.* Evaluation of nutritive quality and components in muscle of brownmarbled grouper *Epinephelus fuscoguttatus*. *Fisheries Science*, 2009, 28(11):

- 635–638 [郭永军, 邢克智, 徐大为, 等. 棕点石斑鱼的肌肉营养成分分析. 水产科学, 2009, 28(11): 635–638]
- Hu Y, Zhou CS, Hu LH, *et al.* Comparative analysis of the nutritional composition in the muscles and skins of *Anguilla japonica* cultured in the seawater and freshwater. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(4): 730–739 [胡园, 周朝生, 胡利华, 等. 海淡水养殖日本鳗鲡肌肉和鱼皮营养成分比较. 水生生物学报, 2015, 39(4): 730–739]
- Jiang JJ, Deng L, Li H. Nutrition evaluation of artificial breeding salmon. *Food and Machinery*, 2011, 27(6): 40–46 [江建军, 邓林, 李华. 人工养殖三文鱼营养成分的分析. 食品与机械, 2011, 27(6): 40–46]
- Jiang TD. Collagen and collagen protein. Beijing: Chemical Industry Press, 2006 [蒋挺大. 胶原与胶原蛋白. 北京: 化学工业出版社, 2006]
- Johnston IA, Li X, Vieira VL, *et al.* Muscle and flesh quality traits in wild and farmed Atlantic salmon. *Aquaculture*, 2006, 256(1–4): 323–336
- Li ZF, Fu QQ, Zhang YS. An analysis of the nutritive composition and the contents of amino acids in muscle of *Epinephelus lanceol.* *South China Fisheries Science*, 2008, 4(5): 61–64 [黎祖福, 付倩倩, 张以顺. 鞍带石斑鱼肌肉营养成分及氨基酸含量分析. 南方水产, 2008, 4(5): 61–64]
- Liu CL, Chen SQ, Wang YT, *et al.* The analysis and evaluation of the nutritive composition of the muscles of Sablefish (*Anoplopoma fimbria*). *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(2): 133–139 [刘长琳, 陈四清, 王有廷, 等. 裸盖鱼肌肉的营养成分分析与评价. 渔业科学进展, 2015, 36(2): 133–139]
- Liu J, Chen YX, Ma L. Fishes of the Bohai Sea and Yellow Sea. Beijing: Science Press, 2015, 172 [刘静, 陈咏霞, 马琳. 黄渤海鱼类图志. 北京: 科学出版社, 2015, 172]
- Liu SL, Wang B, Zhang XL, *et al.* Analysis and evaluation of nutrition composition of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Marine Fisheries Research*, 2002, 23(2): 26–39 [刘世禄, 王波, 张锡烈, 等. 美国红鱼的营养成分分析与评价. 海洋水产研究, 2002, 23(2): 26–39]
- Moran D, Smith CK, Gara B, *et al.* Reproductive behaviour and early development in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi Valenciennes 1833*). *Aquaculture*, 2007, 262(1): 95–104
- Moran D, Smith CK, Lee PS, *et al.* Mortality structures population size characteristics of juvenile yellowtail kingfish *Seriola lalandi* reared at different densities. *Aquatic Biology*, 2011, 11(3): 229–238
- Rapoport SI, Rao JS, Igarashi M. Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver. *Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids*, 2007, 77(5–6): 251–261
- Shiraishi T, Ohshimo S, Yukami R. Age, growth and reproductive characteristics of gold striped amberjack *Seriola lalandi* in the waters off western Kyushu, Japan. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 2010, 44(2): 117–127
- Sun ZW, Yin HB. Analysis of the nutritional composition of six kinds of cold-water fishes. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2004, 26(5): 386–389 [孙中武, 尹洪滨. 六种冷水鱼肌肉营养成分分析与评价. 营养学报, 2004, 26(5): 386–389]
- Wang B, Li Q. Progress on metabolic and nutritional physiological function of leucine. *Feed Research*, 2012(1): 14–16 [王彬, 李奇. 亮氨酸的代谢及营养生理作用研究进展. 饲料研究, 2012(1): 14–16]
- Wang JY, Zhang DR, Ma JJ, *et al.* Nutritional components analysis and nutritive value evaluation of ♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *E. lanceolatus* muscles. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2015(4): 61–69 [王际英, 张德瑞, 马晶晶, 等. 珍珠龙胆石斑鱼肌肉营养成分分析与品质评价. 海洋湖沼通报, 2015(4): 61–69]
- Wang P, Zhang YB, Jiang ML. Research advance in polyunsaturated fatty acid. *China Oils and Fats*, 2008, 33(12): 42–46 [王萍, 张银波, 江木兰. 多不饱和脂肪酸的研究进展. 中国油脂, 2008, 33(12): 42–46]
- Wang W, Zhang WM. Function and characterization of MUFA. *Food and Nutrition in China*, 2005(4): 44–46 [王伟, 张伟敏. 单不饱和脂肪酸的功能特性. 中国食物与营养, 2005(4): 44–46]
- Wang YH, Chen SQ, Lü ZH, *et al.* Analysis of the nutritional components of *Verasper variegates* T. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2006, 28(3): 271–272 [王远红, 陈四清, 吕志华, 等. 圆斑星鲷鱼的营养成分分析. 营养学报, 2006, 28(3): 271–272]
- Wu YW, Ouyang J. The delicious function of amino acids and peptides in food. *Chinese Condiment*, 2001(1): 21–24 [武彦文, 欧阳杰. 氨基酸和肽在食品中的呈味作用. 中国调味品, 2001(1): 21–24]
- Xu SP. The relationship between iron and human health. *Food and Nutrition in China*, 2007(12): 51–54 [徐素萍. 微量元素铁与人体健康的关系. 中国食物与营养, 2007(12): 51–54]
- Yang JS, Huo JC, Xia SY. The analysis of nutrients of different tuna. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2013, 32(5): 393–398 [杨金生, 霍健聪, 夏松养. 不同品种金枪鱼营养成分的研究与分析. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2013, 32(5): 393–398]
- Yang J, Chang R. Progress on α -Linolenic Acid. *Agricultural Engineering*, 2011, 72–76 [杨静, 常蕊. α -亚麻酸的研究进展. 农业工程, 2011, 72–76]
- Ye BQ, Tao NP, Wang XC. Analysis and evaluation of nutritional composition of *Cololabis saira* muscle. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2014, 36(4): 406–408 [叶彬清, 陶宁萍, 王锡昌. 秋刀鱼肌肉营养成分分析及评价. 营养学报, 2014, 36(4): 406–408]
- You HZ, Sun ZJ, Zhang Q, *et al.* Nutritional components analysis and nutritive value evaluation in *Plectropomus leopardus* muscle. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(6):

- 1168–1172 [尤宏争, 孙志景, 张勤, 等. 豹纹鳃棘鲷肌肉营养成分分析与品质评价. 水生生物学报, 2014, 38(6): 1168–1172]
- Zhang CE, Zhang H, Liu CY, *et al.* Progress in linoleic acid research. *Cereals and Oils Processing*, 2010(5): 18–21 [张春娥, 张惠, 刘楚怡, 等. 亚油酸的研究进展. 粮油加工, 2010(5), 18–21]
- Zhang SL, Sun XJ, Zhang X, *et al.* The dressing rate and nutrient components in muscle of *Leiocassis longirostris*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2013, 28(1): 83–88 [张升利, 孙向军, 张欣, 等. 长吻鲷含肉率及肌肉营养成分分析. 大连海洋大学学报, 2013, 28(1): 83–88]

(编辑 冯小花)

Analysis and Evaluation of Nutritional Composition of the Muscle of Yellowtail Kingfish (*Seriola aureovittata*)

LIU Xuezhou^{1,2①}, XU Yongjiang^{1,2}, LI Rong³, LÜ Yongjun³, SHI Bao^{1,2}, NING Jinsong^{1,2}, WANG Bin^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. Dalian Fugu Fishery Co., Ltd., Dalian 116400)

Abstract *Seriola aureovittata*, yellowtail kingfish, is a globally-distributed marine pelagic fish species. This fish has high market value because of its excellent taste and nutrition. Many countries including China have launched artificial culture programs of *S. aureovittata*. In order to better evaluate its nutritional value and edibility, we analyzed and compared the nutritional composition of the muscles of farmed and wild fish using national standard methods. It showed that *S. aureovittata* had high levels of crude protein, essential amino acids, and delicious amino acids in the muscle, which well complied with the ideal protein standard suggested by Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO). This demonstrated that *S. aureovittata* was a good protein source for human. According to the amino acid score (AAS) and chemical score (CS) values, the first and second restriction amino acids of the fish were Met and Val respectively. We also found the crude fat content in the muscle of *S. aureovittata* was higher than that of other fish species such as salmon, tuna, and groupers. Moreover, the contents of unsaturated fatty acid, especially the DHA-EPA combination in the muscle were high, which guaranteed good tasty and high nutritional value. Furthermore, the high level of minerals in the muscle was greatly beneficial for human metabolism and health. It was also shown that there was no significant difference in nutritional composition between farmed and wild *S. aureovittata*, although the former had moderately higher crude fat content and lower water content. The EP values for farmed and wild *S. aureovittata* were 13.44 kJ/g and 8.68 kJ/g respectively. In conclusion, *S. aureovittata* is enriched in proteins and high quality fat, therefore should be a promising candidate fish species for large-scale aquaculture in the near future.

Key words *Seriola aureovittata*; Muscle; Nutritional composition; Nutrition evaluation

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

黄条鲷(*Seriola aureovittata*)染色体核型分析

史 宝^{1,2} 刘永山^{1,3} 柳学周^{1,2,3①} 徐永江^{1,2}
李 荣⁴ 宋雪松^{1,3} 周丽青^{1,2}



(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 4. 大连富谷水产有限公司 大连 116400)

摘要 以黄海北部沿海捕获的野生黄条鲷(*Seriola aureovittata*)为实验材料, 经过体内注射植物血球凝聚素(PHA)和秋水仙素, 取头肾细胞, 经空气干燥法制片, Giemsa 染液染色后, 观察黄条鲷的染色体核型和特征。本研究分析了 21 条黄条鲷的 80 个中期染色体核型, 结果显示, 黄条鲷核型有 48 条染色体, $2n=48$ 占所观察分裂相的比例是 81.25%; 第 1 对染色体有次缢痕和随体。核型公式为 $2n=48=6sm+4st+38t$, 其染色体臂的数量为 54, 单倍体染色体总长度约为 51.97 μm 。黄条鲷染色体核型比较独特, 具有 3 对亚中部染色体和 2 对亚端部染色体; 不同于以往报道的其他鲷属鱼类的染色体核型特征。通过比较分析认为, 黄条鲷为进化上的高位类群中的特化类群。本研究为鲷属鱼类的细胞遗传学研究提供了基础资料, 并为黄条鲷种质资源保护及未来人工养殖等奠定基础。

关键词 黄条鲷; 染色体; 核型; 随体

中图分类号 TS201.4; S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0136-06

黄条鲷(*Seriola aureovittata*), 中国沿海渔民俗称黄腱牛、黄腱子, 为全球性广泛分布的暖温性中上层大型洄游性鱼类。鲷属鱼类全世界共有 9 种, 广泛分布在太平洋、印度洋、大西洋、澳大利亚、南非、地中海等沿岸(王波等, 2005), 中国共有 3 种, 包括五条鲷(*Seriola quinqueradiata*)、高体鲷(*Seriola dumerili*)、黄条鲷, 其中, 黄条鲷在黄海、渤海、东海、南海均有分布, 是黄渤海区唯一自然分布的大型鲷属鱼类(孟庆闻等, 1995)。黄条鲷在种的分类单元包含 3 个体型相似、地理分布不同的种群: 加利福尼亚种群 *Seriola dorsalis* (California yellowtail); 亚洲种群 *Seriola aureovittata* (Asian yellowtail)和澳洲南部种群 *Seriola lalandi* (Southern yellowtail) (Chai *et al*,

2009)。黄条鲷是具有潜力的商业养殖品种和垂钓消遣鱼类, 具有生长速度较快, 肉质鲜嫩、养殖产量高等优点, 深受广大消费者喜爱, 世界范围内消费需求不断增加, 市场前景广阔。目前, 澳大利亚、新西兰、日本等国家已开始进行黄条鲷的养殖技术研究(Nakada, 2008)。

染色体是生物发育、进化、遗传和变异的物质基础, 研究染色体的行为、数目、核型和带型等对于了解生物的遗传组成、遗传变异规律、发育机制、物种起源和亲缘关系、进化地位、分类及种族关系等都具有重要的参考价值(Amores *et al*, 2014; 王绿洲等, 2015; Braasch *et al*, 2016)。染色体核型图谱可为鱼类种质鉴定提供参考依据, 也是多倍体诱导、雌核发育、

* 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2016PT07)、青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划专项项目(2015ASKJ02-03)和国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50)共同资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, Chinese Academy of Fishery Sciences (No.2016PT07), the Aoshan S&T Innovation Project from Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2015ASKJ02-03), and China Agricultural Research System (CARS-50)] 史 宝, E-mail: shibao@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-08-16, 收修改稿日期: 2016-09-22

雄核发育、种间杂交和种内杂交研究的重要参考(Martínez *et al.*, 2014; Molina-Luzón *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2000)。目前,国内关于黄条鲷生物学及养殖方面的研究报道很少,仅见姜大为等(2001)开展过黄条鲷室内越冬养殖实验,对于黄条鲷核型分析的研究尚未见报道。本研究中,对中国黄海北部海域黄条鲷的染色体核型进行了分析研究,旨在探究黄条鲷遗传物质的特点,为其种质鉴定、遗传资源保护、可持续利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用鱼为2015年8月在黄海北部的海洋岛附近海域捕获的体长为8–10 cm的野生黄条鲷苗种,经人工驯化后,采用10 m×10 m×8 m的网箱在海上养殖6个月后,转入室内工厂化养殖车间越冬;养殖期间投喂鲜杂鱼饵料,养殖水温为16–28℃、盐度为26–33、pH为8.0–8.3;日投饵2–3次,投饵量为鱼体重的3%–6%。实验在大连富谷水产养殖有限公司进行,实验共使用黄条鲷幼鱼21尾,体重为300–450 g,体长为30–35 cm,体高为7–8 cm。

1.2 染色体标本的制备

实验鱼麻醉后胸鳍基部注射植物血球凝聚素(PHA)(Sigma)溶液(0.7%的生理盐水配制),剂量为20 μg/g(鱼体湿重)。注射后将实验鱼放回养殖池中,用小型网箱与其他鱼隔开,流水培育,4–6 h后在同一部位注射秋水仙素溶液(0.7%生理盐水配制),剂量为2.5 μg/g(鱼体湿重)。

注射秋水仙素1 h后用注射器抽取实验鱼血液,在鱼死前解剖,取头肾,去掉其他杂质,置于装有少许生理盐水的培养皿中,用解剖剪反复剪碎后,用纱布将细胞悬液过滤,1000 r/min离心8 min,收集细

胞。用生理盐水洗涤后,用0.075 mol/L KCl溶液低渗处理30 min,1000 r/min离心8 min,弃去低渗液。加入新鲜配制的预冷的卡诺氏固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)固定30 min,再重复固定2次,离心弃去固定液,加入400 μl新鲜预冷的固定液。

将处理干净的载玻片和一块大理石在烘箱中烘至65℃。滴片时先将大理石放在滴片的位置,滴片高度为120–130 cm,玻片在室温下自然干燥后,用10%吉姆萨染液(pH=6.8)染色20 min,蒸馏水冲洗后,在室温下自然干燥。

1.3 核型分析

将染色体制片置于Nikon ECLIPSE 80i显微镜下观察,选用染色体着色较好、着丝粒明显、无重叠的中期分裂相片子,在油镜下选取20个染色体分散良好、长度适中的分裂相进行显微摄影。按Levan等(1964)提出的命名和分类标准,按臂比将染色体分为4组:(1)中部着丝点染色体为m组,臂比为1.00–1.70;(2)亚中部着丝点染色体为sm组,臂比为1.71–3.00;(3)亚端部着丝点染色体为st组,臂比为3.01–7.00;(4)端部着丝点染色体为t组,臂比≥7.0。

2 结果与分析

2.1 染色体数目

在显微镜下选取80个分散良好的分裂相进行观察计数,确定 $2n$ 值。通过核型分析得知,黄条鲷染色体的众数为48,核型是 $2n=48$,染色体臂数为54。没有发现异型染色体,但发现第1对染色体有随体和次缢痕。黄条鲷染色体的中期分裂相和核型图谱见图1。观察、统计染色体的结果显示,黄条鲷的染色体条数为48的分裂相有65个,占比为81.25%,由此确定,黄条鲷的染色体数目 $2n=48$ 。其他不同数目染色体核型结果见表1。

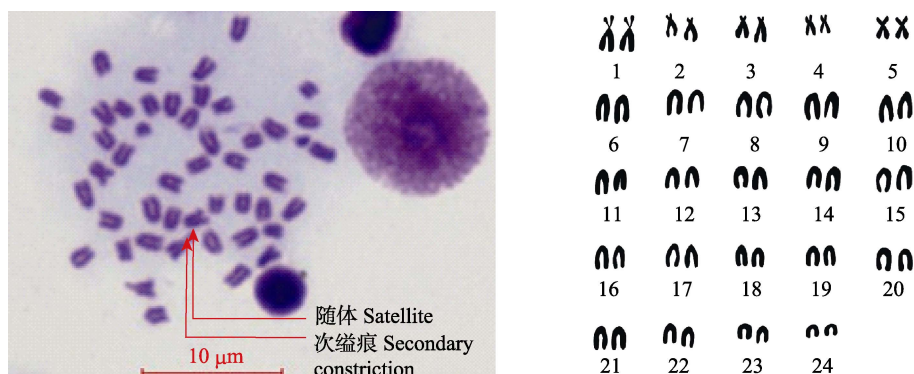


图1 黄条鲷中期分裂相形态及核型图谱

Fig.1 Metaphase morphology and the karyotype map of *S. aureovittata*

表1 黄条鲮染色体频率分布
Tab.1 The frequency distribution of *S. aureovittata* chromosome

项目 Items	染色体数目 Number of chromosome				
	≤45	46	47	48	≥49
分裂相数目 Number of metaphase	4	6	3	65	2
所占百分比(%) Percentage of metaphase	5	7.5	3.75	81.25	2.5

2.2 染色体相对长度

通过测量与数据统计分析, 黄条鲮染色体臂长、

染色体长、臂比、相对长度、着丝粒指数及染色体类型见表2。由表2可知, 黄条鲮具有24对染色体, 其中有3对亚中部染色体, 臂比分别为 $2.07\pm 0.63(\text{sm})$ 、 $2.19\pm 0.20(\text{sm})$ 、 $1.82\pm 0.87(\text{sm})$; 有2对亚端部染色体, 臂比分别为 $3.82\pm 1.24(\text{st})$ 和 $4.83\pm 1.53(\text{st})$; 其余19对臂比为 ∞ , 为端部着丝点染色体。24对染色体相对长度逐渐递减, 各对相邻染色体之间相对长度差异不明显。染色体的相对长度最长为 $(5.16\pm 0.56)\%$, 属于亚中部着丝点染色体; 染色体的相对长度最短为 $(2.50\pm 0.23)\%$, 属于端部着丝点染色体。确定本研究黄条鲮的核型公式为 $2n=48=6\text{sm}+4\text{st}+38\text{t}$ 。

表2 黄条鲮染色体的相对长度及臂比值(平均值±标准差)
Tab.2 The relative length and arm ratio of chromosome of *S. aureovittata* (Mean±SD)

编号 No.	长臂长 Long arm(μm)	短臂长 Short arm(μm)	总长度 Total length(μm)	臂比 Arm ratio	相对长度 Relative length(%)	着丝粒指数 Centromeric index(%)	类型 Classification
1	1.81±0.09	0.87±0.03	2.68±0.09	2.07±0.63	5.16±0.56	32.46±5.40	sm
2	2.10±0.06	0.55±0.04	2.65±0.02	3.82±1.24	5.00±0.37	20.75±5.50	st
3	1.87±0.07	0.39±0.06	2.26±0.05	4.83±1.53	4.35±0.29	17.26±7.70	st
4	1.48±0.03	0.68±0.03	2.16±0.04	2.19±0.20	4.17±0.24	31.48±3.60	sm
5	1.29±0.02	0.71±0.05	2.00±0.04	1.82±0.87	3.86±0.22	35.50±6.00	sm
6	2.48±0.07	—	2.48±0.09	∞	4.69±0.56	—	t
7	2.45±0.06	—	2.45±0.07	∞	4.69±0.46	—	t
8	2.41±0.04	—	2.42±0.04	∞	4.63±0.21	—	t
9	2.39±0.05	—	2.39±0.05	∞	4.57±0.32	—	t
10	2.29±0.06	—	2.29±0.06	∞	4.50±0.37	—	t
11	2.26±0.07	—	2.26±0.07	∞	4.50±0.41	—	t
12	2.26±0.03	—	2.26±0.04	∞	4.38±0.24	—	t
13	2.23±0.02	—	2.23±0.02	∞	4.19±0.13	—	t
14	2.16±0.07	—	2.16±0.07	∞	4.19±0.42	—	t
15	2.16±0.07	—	2.16±0.07	∞	4.07±0.43	—	t
16	2.10±0.07	—	2.10±0.08	∞	3.88±0.42	—	t
17	2.06±0.05	—	2.06±0.05	∞	3.88±0.28	—	t
18	2.00±0.08	—	2.00±0.08	∞	3.88±0.46	—	t
19	1.97±0.03	—	1.97±0.03	∞	3.88±0.17	—	t
20	1.97±0.05	—	1.97±0.05	∞	3.81±0.29	—	t
21	1.97±0.05	—	1.97±0.06	∞	3.75±0.31	—	t
22	1.97±0.06	—	1.97±0.06	∞	3.69±0.36	—	t
23	1.84±0.05	—	1.84±0.05	∞	3.44±0.27	—	t
24	1.26±0.04	—	1.26±0.04	∞	2.50±0.23	—	t

3 讨论

本研究采用 PHA 注射法制备黄条鲮染色体核型图谱, 此方法直接进行体内腹腔注射, 不受季节、实

验条件限制, 实验设备简单、易操作, 制片周期短, 在6h内即可获得大量的中期分裂相, 效果良好。PHA与秋水仙素的剂量和效应时间不易把握, PHA作用时间过长或过短都不易得到较好的分裂相, 秋水仙素

浓度过大或作用时间过长会使染色体有不同程度的皱缩, 因此, 正确掌握不同实验鱼 PHA 和秋水仙素的浓度与作用时间是得到理想染色体标本的关键因素。王妍妍等(2009)在条斑星鲷(*Verasper moseri*)染色体核型研究中注射 PHA 剂量为 20 $\mu\text{g/g}$ (鱼体湿重), 本研究也尝试采用 20 $\mu\text{g/g}$ 的剂量, 作用时间 4–6 h 后注射秋水仙素, 秋水仙素作用时间为 1–1.5 h, 得到比较好的中期分裂相。

本研究黄条鲷的染色体核型图谱显示, 第 1 对染色体有明显的次缢痕和随体, 随体是染色体核型中的重要特征, 随体的存在更利于与其他染色体区分。但是, 在南澳大利亚黄条鲷染色体核型的研究中没有报道次缢痕和随体的存在(Chai *et al.*, 2009), 这为鉴定不同地理种群的黄条鲷提供了一个判定依据。这种细微差别有可能来源于实验手段或染色体结构重排程度等方面的差异, 需要通过进一步的细胞遗传学手段来予以证实。本研究得到黄海北部沿海黄条鲷的核型为 $2n=48=6\text{sm}+4\text{st}+38\text{t}$, 其中, 6 条为亚中部着丝粒染色体, 4 条为亚端部着丝粒染色体, 38 条染色体为端着丝粒染色体。本研究黄条鲷染色体与迄今为止已研究的 4 种鲷属鱼类[高体鲷、黑纹条鲷(*Seriolina nigrofasciata*)、五条鲷、澳洲南部黄条鲷]染色体数目相同, 均为 $2n=48$; 进一步分析发现, 高体鲷、五条鲷和澳洲南部黄条鲷的核型特征包含亚中部着丝粒染色体、亚端部着丝粒染色体和端着丝粒染色体; 黑纹条鲷只含有端着丝粒染色体(Vitturi *et al.*, 1986; Sola *et al.*, 1997; Tripathy *et al.*, 1988; Ida *et al.*, 1978; Chai *et al.*, 2009); 其中, 高体鲷、黑纹条鲷和五条鲷染色体均未发现有中部着丝粒染色体, 而南澳大利亚黄条鲷种群发现有 2 条中部着丝粒染色体, 本研究黄海北部沿海黄条鲷也未发现中部着丝粒染色体, 这可认为是不同地理种群的黄条鲷染色体核型特征上的另一个明显差异。

迄今为止, 所研究的大约 60% 的鲈形目鱼类具有 48 条端着丝粒染色体, 包括鲷科(Sparidae)、石首鱼科(Sciaenidae)、鲷科(Bleniidae)、冰鱼科(Channichthyidae)、南极鱼科(Nototheniidae)、鲈科(Serranidae)(Galetti *et al.*, 2000)。在鲈科中, 报道了大约 85% 鱼类的核型为 $2n=48$, 但还有不到 30% 鱼类的核型为端着丝粒染色体(Chai *et al.*, 2009)。在鲈科的一些属中, 例如竹筴鱼属(*Trachurus*)染色体臂的数目变化比较大, 从 50–66 不等, 这表明鲈科鱼类的核型与鲈形目其他科鱼类的核型相比具有更丰富的多样性。染色体的多态性可能归因于群体隔离和遗传分

化(Galetti *et al.*, 2000)。研究报道鲈科中的鲷属鱼类染色体臂数目为 48–54, 高体鲷为 50、黑纹条鲷为 48、五条鲷为 50 (Vitturi *et al.*, 1986; Sola *et al.*, 1997; Tripathy *et al.*, 1988; Ida *et al.*, 1978), 本研究中, 黄海北部沿海黄条鲷的染色体臂数目为 54, 在鲷属鱼类染色体臂数目 48–54 之间。由以上分析可知, 鲷属鱼类染色体核型特征存在着明显的种间差异, 因此, 可以通过染色体核型分析进行鲷属鱼类的分类鉴定和种质标准的评定。鲈形目石鲷属的雄性斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)具有一条异形性染色体, 可能是性染色体 Y, 并推测其染色体的性别决定类型可能为 $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ 型(薛蕊等, 2016)。本研究使用的不足 1 龄的黄条鲷幼鱼染色体核型图谱中没有找到与性别决定有关的异型染色体, 今后可在黄条鲷繁殖季节采集成熟的雌、雄鱼, 进一步采用染色体荧光原位杂交等染色方法阐明黄条鲷是否存在性染色体。

小岛吉雄(1979)在研究染色体时对真骨鱼类进行了划分, 提出了 3 个演化类群, 分别为低位类、中位类和高位类; 并且, 高位类群鱼在进化上处于上位, 其染色体数目越收敛, 中部和亚中部着丝粒染色体少, 端部和亚端部着丝粒染色体数目多(小岛吉雄, 1979; 李鹏飞等, 2007)。同时, 在分类阶元中端部着丝粒染色体多的种类为基本类群; 中部或者亚中部着丝粒较多为特化类群, 即染色体臂数越多的类群更特化(李树深, 1981)。本研究中, 黄海北部黄条鲷染色体数目 $2n=48=6\text{sm}+4\text{st}+38\text{t}$, 端部、亚端部着丝粒染色体数目为 42 条, 中部、亚中部着丝粒染色体数目为 6 条, 符合以上的类群判定标准; 黄海北部黄条鲷的染色体相对长度变化不大, 变化范围为 $(2.50\pm 0.23)\%$ – $(5.16\pm 0.56)\%$, 黄条鲷染色体的中期分裂相的核型图谱显示, 端部着丝粒染色体 38 条, 染色体臂数目为 54, 因此, 黄海北部沿海黄条鲷属于高位中更为特化的类群。Ohara 等(2005)采用微卫星标记的方法构建了日本 2 种重要养殖鲷属鱼类五条鲷和黄条鲷遗传连锁图谱, 但是没有报道其进化地位。今后有必要对不同地理种群的鲷属鱼类深入分析其进化关系。

参 考 文 献

- Amores A, Catchen J, Nanda I, *et al.* A RAD-tag genetic map for the platyfish (*Xiphophorus maculatus*) reveals mechanisms of karyotype evolution among teleost fish. *Genetics*, 2014, 197(2): 625–641
- Braasch I, Gehrke AR, Smith JJ, *et al.* The spotted gar genome illuminates vertebrate evolution and facilitates human-teleost comparisons. *Nature Genetics*, 2016, 48(4): 427–437

- Chai XL, Li XX, Lu RM, *et al.* Karyotype analysis of the yellowtail kingfish *Seriola lalandi lalandi* (Perciformes: Carangidae) from South Australia. *Aquaculture Research*, 2009, 40(15): 1735–1741
- Ida H, Murofushi S, Fujiwara S, *et al.* Preparation of fish chromosomes by *in vitro* colchicine treatment. *Japanese Journal of Ichthyology*, 1978, 24(4): 281–284
- Galetti PM, Aguilar CT, Molina WF. An overview of marine fish cytogenetics. *Hydrobiologia*, 2000, 420(1): 55–62
- Jiang DW, Lin LL, Chen Y, *et al.* Indoor wintering and growth of *Seriola aureorvtata* Temminck et Schegel. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2001, 16(3): 223–227 [姜大为, 林乐玲, 陈勇, 等. 黄条鲷室内越冬及生长观察. 大连水产学院学报, 2001, 16(3): 223–227]
- Khan TA, Bhise MP, Lakra WS. Chromosome manipulation in fish—a review. *Indian Journal of Animal Science*, 2000, 70(2): 213–221
- Levan A, Fredga K, Sandberg A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 1964, 52(2): 201–220
- Li PF, Liu P, Liu XZ. Study on the karyotype of *Paralichthys lethostigma*. *Marine Fisheries Research*, 2007, 28(4): 26–30 [李鹏飞, 刘萍, 柳学周. 漠斑牙鲆染色体组型研究. 海洋水产研究, 2007, 28(4): 26–30]
- Li SS. Taxonomy of fish cell. *Science Trends of Biology*, 1981(2): 8–15 [李树深. 鱼类细胞分类学. 生物科学动态, 1981(2): 8–15]
- Martínez P, Viñas AM, Sánchez L, *et al.* Genetic architecture of sex determination in fish: applications to sex ratio control in aquaculture. *Frontiers in Genetics*, 2014, 5: 1–13
- Meng QW, Su JX, Miao XZ. Systematics of fishes. China Agriculture Press, 1995, 672 [孟庆闻, 苏锦祥, 缪学祖. 鱼类分类学. 北京: 中国农业出版社, 1995, 672]
- Molina-Luzón MJ, López JR, Robles F. Chromosomal manipulation in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858): induction of triploidy and gynogenesis. *Journal of Applied Genetics*, 2015, 56(1): 77–84
- Nakada M. Capture-based aquaculture of yellowtail. in *Capture-Based Aquaculture. Global Overview*. FAO Fisheries Technical Paper. No. 508 (ed. by Lovatelli A & Holthus PF), 2008, 199–215
- Ohara E, Nishimura T, Nagakura Y, *et al.* Genetic linkage maps of two yellowtails (*Seriola quinqueradiata* and *Seriola lalandi*). *Aquaculture*, 2005, 244(1–4): 41–48
- Ojima. Aquatic biology and genetic breeding. Tokyo: Water delivery press, 1979, 46–62. [小島吉雄. 水产生物及遗传育种. 东京: 水交出版社, 1979, 46–62]
- Sola L, Cipelli O, Gornung E, *et al.* Cytogenetic characterization of the greater amberjack, *Seriola dumerili* (Pisces: Carangidae), by different staining techniques and fluorescence *in situ* hybridization. *Marine Biology*, 1997, 128(4): 573–577
- Tripathy NK, Das CC. Karyotypes of five Indian Perciform fishes. *Copeia*, 1988(1): 231–233
- Vitturi R, Mazzola A, Macaluso M, *et al.* Chromosomal polymorphism associated with Robertsonian fusion in *Seriola dumerili* (Risso, 1810) (Pisces: Carangidae). *Journal of Fish Biology*, 1986, 29(5): 529–534
- Wang B, Sun PX, Dong ZF. Biological characteristics and breeding of yellowtail. *Fishery Modernization*, 2005(3): 18–20 [王波, 孙丕喜, 董振芳. 黄尾鲷的生物学特性与养殖. 渔业现代化, 2005(3): 18–20]
- Wang LZ, Li L, Li T, *et al.* Karyotype of *Silurus lanzhouensis*. *Chinese Journal of Zoology*, 2015, 50(2): 272–276 [王绿洲, 李蕾, 李涛, 等. 兰州鲇染色体组型. 动物学杂志, 2015, 50(2): 272–276]
- Wang YY, Liu XZ, Xu YJ, *et al.* Study on the karyotype of *Verasper moseri*. *Progress in Fisheries Science*, 2009, 30(2): 8–13 [王妍妍, 柳学周, 徐永江等. 条斑星鲈染色体核型分析. 渔业科学进展, 2009, 30(2): 8–13]
- Xue R, An H, Liu QH, *et al.* Karyotype and AG-NORS in male and female of *Oplegnathus punctatus*. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2016, 47(3): 626–632 [薛蕊, 安皓, 刘清华, 等. 斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)雌、雄鱼核型及 Ag-NORS 带型分析. 海洋与湖沼, 2016, 47(3): 626–632]

(编辑 冯小花)

Study on the Karyotype of Yellowtail Kingfish (*Seriola aureovittata*)

SHI Bao^{1,2}, LIU Yongshan^{1,3}, LIU Xuezhou^{1,2,3}^①, XU Yongjiang^{1,2},
LI Rong⁴, SONG Xuesong^{1,3}, ZHOU Liqing^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 4. Dalian Fugu Fishery Co., Ltd., Dalian 116400)

Abstract Karyological study is a useful tool in exploring evolutionary mechanisms of fish because it provided basic information on the number, size and morphology of chromosomes. In this study we characterized the karyotype and chromosomal characteristics of the yellowtail kingfish *Seriola aureovittata* by examining metaphase spreads from head kidney cells of one-year-old fish artificially bred from wild broodstock in the Dalian coast of China. Chromosome samples were prepared through *in vivo* injection of phytohemagglutinin (PHA), olchicine-air drying technique, and Giemsa staining. A total of 80 mitotic metaphases from 21 individuals were analyzed, and 65 spreads showed $2n=48$ chromosomes, which represented 81.25% of the observed metaphases. The relative size of the chromosomes in this subspecies varied from $(2.50\pm 0.23)\%$ to $(5.16\pm 0.56)\%$. The long arm, short arm, and total length of the first submetacentric chromosomes were $(1.81\pm 0.09)\ \mu\text{m}$, $(0.87\pm 0.03)\ \mu\text{m}$, and $(2.68\pm 0.09)\ \mu\text{m}$ respectively. Two pairs of subtelocentric chromosomes were found in this subspecies. The length of their short arms was $(0.55\pm 0.04)\ \mu\text{m}$ and $(0.39\pm 0.06)\ \mu\text{m}$, and that of the long arms was $(2.10\pm 0.06)\ \mu\text{m}$ and $(1.87\pm 0.07)\ \mu\text{m}$. The diploid consisted of 4 submetacentric, 6 subtelocentric, and 38 telocentric chromosomes, and the fundamental number of chromosome arms was 54. The first pair of chromosomes had secondary constriction and satellite. The karyotype formula for this species was determined to be $2n=48 = 6\text{sm} + 4\text{st} + 38\text{t}$. The total haploid chromosome length was approximately $51.97\ \mu\text{m}$. The fact that *S. aureovittata* has 3 pairs of submetacentric and 2 pairs of subtelocentric chromosomes distinguishes this species from other previously reported *Seriola* species. The comparison of karyotypes suggested that *S. aureovittata* might belong to an advanced and specific evolutionary group. Our study promoted the understanding of the specific karyotype evolution of the genus *Seriola*, and provided information on the polyploidy manipulation, hybridization, and sex control.

Key words *Seriola aureovittata*; Chromosome; Karyotype; Satellite

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

黄条鲷(*Seriola aureovittata*)形态度量 与内部结构特征*



李 荣¹ 徐永江^{2,3} 柳学周^{2,3①} 史 宝^{2,3}

(1. 大连富谷水产有限公司 大连 116400; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室
青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 为了全面认识黄条鲷(*Seriola aureovittata*)生物学特性,利用传统测量方式、框架测度法、几何形态测量法和解剖学方法,观察和测度了其外部形态特征、可量与可数性状及内部结构特征,并模拟构建了黄条鲷形态性状度量框架图。观察了黄条鲷不同部位鳞片和耳石形态特征,比较了各形态度量性状的比值关系,发现全长与体长比值、下颌长与上颌长比值、尾柄长与尾柄高比值变异较小,表明这些性状关联密切。利用统计分析方法建立了黄条鲷全长(TL)与体重(BW)之间的关系模型: $BW=2.1652TL^2-140.35TL+2479.9$ ($R^2=0.9812$),体高(BH)与体重间的关系模型: $BW=0.7575BH^{3.0059}$ ($R^2=0.9816$)。研究分析表明,在黄条鲷的 12 个可量形态性状中,除眼径外的其他 11 个形态性状间均存在显著相关关系。通径分析进一步揭示了体高和体长性状是影响体重的 2 个关键因素,其对体重的决定程度分别达 41.34% 和 13.11%,它们对体重的共同决定程度达 42.88%。本研究观察描述了黄条鲷内部结构特征,其比肠长为 0.62–0.69,脊椎骨数量为 23–25,总出肉率可达 75%。本研究结果可为黄条鲷种质判别、系统分类及人工繁育与养殖技术开发提供形态认知依据。

关键词 黄条鲷; 形态性状; 度量判别; 内部结构

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0142-08

黄条鲷(*Seriola aureovittata*)属鲈形目(Perciformes)、鲹科(Carangidae)、鲷属(*Seriola*),是全球海洋中已知 9 种鲷属鱼类之一,又称黄尾鲷、拉氏鲷,俗称黄腱牛、黄腱子、油甘。黄条鲷是一种在全球海洋广泛分布的大洋性鱼类,朝鲜半岛、日本、非洲南部、澳大利亚、美国、印度、南非海域、印度洋及我国的黄海、渤海、东海、南海均有分布(张春霖, 1955; 刘静等, 2015),属于中上层温水性远洋洄游鱼类,具有较高的经济价值和营养价值。黄条鲷具有形

体大、生长快、肉质鲜美、营养丰富等特点,是一种适宜于深远海抗风浪网箱养殖和陆基工厂化养殖生产的新经济鱼种。

形态特征是鱼类等动物最直观的种质表现之一(熊鹰等, 2015),形态度量是研究生物表观形态性状的手段,可提供目标种类识别的关键形态参数,同时也可为其分类地位判别、系统进化分析、种质资源鉴定、遗传育种目标性状筛选等研究提供技术支持(李思发, 1998)。另外,通过分析形态特征与生态因

* 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2016PT07)、青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划专项项目(2015ASK-J02-03)和国家鲆鲽类产业技术体系项目(CARS-50)共同资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (NO.2016PT07), the Scientific and Technological Innovation Project Financially Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2015ASKJ02-03) and China Agriculture Research System (CARS-50)]. 李 荣, E-mail: fglirong@163.com

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-08-05, 收修改稿日期: 2016-09-02

子变量(捕食策略、摄食方式、运动行为、繁殖习性等)的关系, 可为分析物种种群的形态功能多样性和生物多样性研究提供重要的依据(张堂林等, 2008; Farré *et al.*, 2013)。近年来, 我国开展了黄条鲷的人工繁育和养殖技术开发, 但缺乏对其生物学特性的系统认识, 不利于相关研究的顺利开展。本研究以新兴养殖鱼种—黄条鲷为研究对象, 利用传统测量方式、框架测度法、几何形态测量法、统计分析等手段, 通过对其表观性状和内部结构等形态特征的系统测度与分析, 以期通过形态性状的选择为黄条鲷分类、种质与选育提供形态学证据与判别依据, 同时, 可为深入认识黄条鲷养殖生物学特性和开展人工养殖技术研发提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验鱼来源

2015–2016 年, 采集了来自青岛和大连周边黄海域野生以及人工养殖的黄条鲷样本, 共 66 尾。实验鱼全长为 27–131 cm, 体重为 227–22560 g。实验鱼采集后以 MS-222 麻醉致死(400 mg/L), 用于外部形态性状测量和内部结构观察。

1.2 外部形态性状度量

1.2.1 可数性状测量 对采集的黄条鲷样本计数胸鳍条数、背鳍条数、腹鳍条数、尾鳍条数、臀鳍条数、侧线鳞数、鳃弓数、鳃耙数、幽门盲囊数等可数性状。

1.2.2 可量性状测度 利用卷尺和游标卡尺测量全长、体长、体高、头长、眼后头长、眼径、下颌长、上颌长、尾柄高、尾柄长、眼间距 11 个可量性状, 测量精确到 1 mm。利用电子天平测量体重, 精确到 0.01 g。

1.2.3 鳞片与耳石形态观察 取黄条鲷头部、背部、腹部、尾部鳞片, 以生理盐水(0.9%)浸泡后, 利用 NIKON 80i 显微镜观察拍照外部形态, 利用其自

带的图像处理系统(NIS elements F 4.30)进行图像处理。自听囊中取出耳石, 对其形态进行拍照观察。

利用数码相机(Cannon D90, 日本)对所有测定样本进行拍照, 制作数码图像, 并与其形态学数据对应。按照李思发(1998)的方法, 对黄条鲷外部形态框架进行模拟构建。

1.3 内部结构观察

解剖黄条鲷, 对内脏各组织器官的结构与形态特征进行观察、描述、拍照, 绘制内部结构示意图。利用电子天平对内脏、肝脏进行称量, 精确到 0.01 g。同时, 将肠道完整取出后, 将生理弯曲展开, 测量肠道长度并记录, 精确到 1 mm, 用于计算比肠长。将肌肉分离后计数脊椎骨数量。

1.4 数据统计处理

利用 Microsoft Excel 2013 和统计软件 SPSS 21.0 对数据进行统计处理。对形态性状数据进行相关性分析, 并利用通径分析评价各形态性状对体重的影响效果, 参照王新安等(2008)。设置差异显著性水平, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 黄条鲷外部形态

黄条鲷体型为纺锤形, 侧扁, 体背部为蓝褐色, 腹部为灰白色, 最为明显的特征是体侧自吻端经眼径至尾柄有 1 条明显的金黄色纵带, 各鳍具有黄色边缘。其具体的可数性状见表 1, 其他外部形态特征描述见张春霖(1955)。

黄条鲷通体被圆鳞, 鳞片外观可见鳞焦区、鳞顶区和鳞基区 3 个部分。头部鳞片鳞基区相对较为尖锐, 背部鳞片较为圆钝, 腹部和尾部鳞片也有凸出的鳞基区(图 1)。黄条鲷耳石整体呈齿状, 其前端有内凹, 外观可见清晰的耳石核心区域, 但未能清楚分辨年轮结构(图 2)。

表 1 黄条鲷可数性状
Tab.1 Countable characters of *S. aureovittata*

可数性状 Countable characters	指标 Indices	可数性状 Countable characters	指标 Indices
背鳍数 Dorsal fin number	I, VI, I -31–35	侧线鳞数 Lateral line scale number	175–210
臀鳍数 Anal fin number	II, I -19–22	侧线上鳞数 Scale above lateral line	26–31
胸鳍数 Pectoral fin number	20–22	侧线下鳞数 Scale below lateral line	49–55
腹鳍数 Ventral fin number	I -5	鳃弓数 Branchial arch number	8
尾鳍数 Caudal fin number	17	鳃耙数 Gill raker number	6–9+14–22

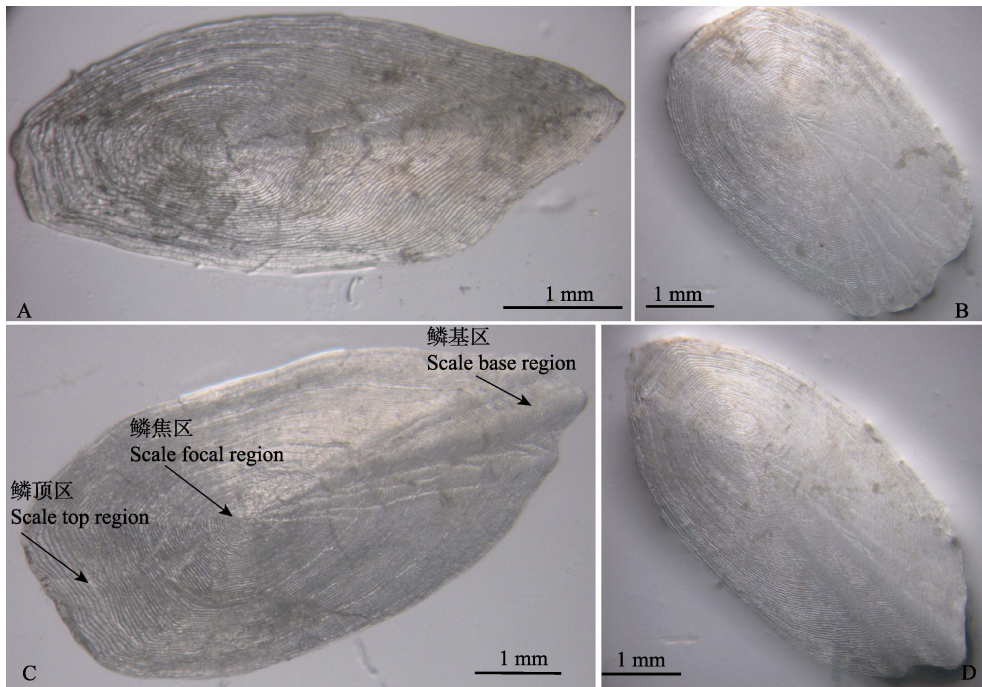


图 1 黄条鲷不同部位鳞片形态特征

Fig.1 The morphology of scales from different body areas of *S. aureovittata*

A: 头部鳞片; B: 背部鳞片; C: 尾部鳞片; D: 腹部鳞片

A: A scale from head area; B: A scale from dorsal area; C: A scale from tail area; D: A scale from ventral area



图 2 黄条鲷耳石背面与腹面形态特征

Fig.2 The external morphology of otolith of *S. aureovittata*

左: 背面; 右: 腹面

Left: Back side; Right: Ventral side

2.2 黄条鲷形态度量性状

黄条鲷的形态度量性状及其测度依据见图 3。其中, 上颌长(UJL)、下颌长(LJL)和眼间距(ID)以实际

测度数据为依据, 未在图中标注。黄条鲷各形态度量性状的比例关系见表 2, 其中, 全长与体长比值的标准差最小(0.066), 其次为下颌长与上颌长的比值(0.171)、尾柄长与尾柄高的比值(0.212), 表明这些性状关联较为密切, 变异较小。按照黄条鲷各形态性状数据及其比值关系, 模拟其形态度量框架(图 4)。

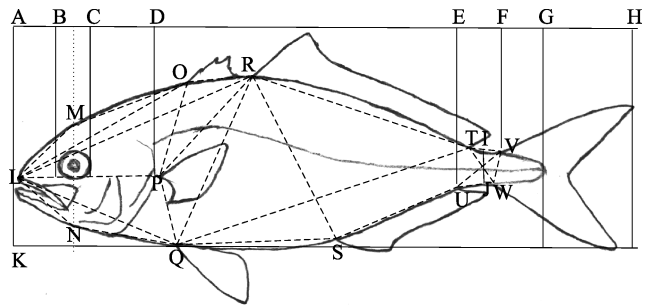


图 3 黄条鲷表观形态度量特征

Fig.3 The schematic diagram of morphologic measurement of *S. aureovittata*

AH: 全长(Total length, TL); AG: 体长(Soma length, SL); AK: 体高(Body height, BH); AD: 头长(Head length, HL);

CD: 眼后头长(Post orbital length, POL); BC: 眼径(Eye diameter, ED); EF: 尾柄长(Caudal peduncle length, PL); IJ: 尾柄高(Caudal peduncle depth, PD)

尾柄高(Caudal peduncle depth, PD)

表 2 黄条鲷形态度量性状比
Tab.2 Ratios between measurable characters of *S. aureovittata*

度量性状比 Ratio between measurable characters	范围 Range	平均值±标准差 Mean±SD
全长/体长 TL/SL	1.078–1.314	1.157±0.066
体长/体高 SL/BH	2.474–4.418	3.570±0.650
体长/头长 SL/HL	2.547–4.642	3.658±0.519
体长/眼后头长 SL/POL	5.280–9.800	7.974±1.209
头长/眼径 HL/ED	3.300–10.042	4.947±1.503
体长/尾柄长 SL/PL	11.417–20.091	15.797±1.730
尾柄长/尾柄高 PL/PD	0.800–1.625	1.250±0.212
头长/眼间距 HL/ID	2.200–5.333	2.647±0.420
体长/上颌长 SL/UJL	5.833–13.768	9.092±1.622
体长/下颌长 SL/LJL	5.269–14.257	8.519±2.198
下颌长/上颌长 LJL/UJL	0.778–1.565	1.099±0.171

2.3 形态性状间关系分析

统计分析表明,黄条鲷全长(TL)与体重(BW)间关系符合如下公式:

$$BW=2.1652TL^2-140.35TL+2479.9 (R^2=0.9812)$$

体高(BH)与体重之间的关系符合如下公式:

$$BW=0.7575BH^{3.0059} (R^2=0.9816)$$

利用相关分析方法计算了各表型性状间的相关性(表 3)。结果显示,所分析的 12 个可量表型性状中,除眼径外其他 11 个性状间均存在显著正相关关系($P<0.05$)。

表 3 黄条鲷各表型性状间相关性分析

Tab.3 Correlation coefficients among morphometric traits of *S. aureovittata*

性状 Traits	TL	SL	BH	HL	POL	ED	ID	UJL	LJL	PD	PL	BW
TL	1.000	0.983**	0.929**	0.933**	0.932**	0.128	0.630**	0.885**	0.910**	0.755**	0.841**	0.957**
SL		1.000	0.921**	0.945*	0.941**	0.102	0.649**	0.877**	0.908**	0.753**	0.806**	0.953**
BH			1.000	0.962**	0.958**	0.174	0.755**	0.927**	0.964**	0.761**	0.711**	0.976**
HL				1.000	0.960**	0.162	0.725**	0.935**	0.938**	0.792**	0.709**	0.965**
POL					1.000	0.093	0.711**	0.912**	0.939**	0.764**	0.701**	0.956**
ED						1.000	0.399*	0.053	0.076	-0.160	0.152	0.161
ID							1.000	0.649**	0.656**	0.322	0.395*	0.753**
UJL								1.000	0.944**	0.832**	0.674**	0.921**
LJL									1.000	0.862**	0.703**	0.952**
PD										1.000	0.598**	0.770**
PL											1.000	0.721**
BW												1.000

*表示差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$)。下同

Asterisk (*) indicates significant difference ($P<0.05$), double asterisk (**) indicates highly significant difference ($P<0.01$). The same as below

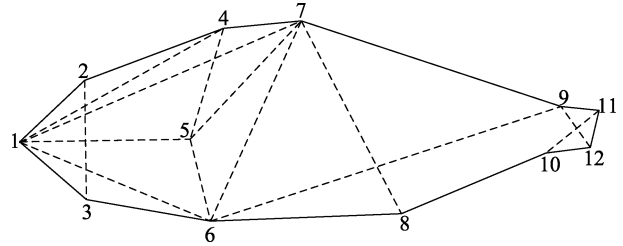


图 4 黄条鲷表观形态性状度量框架图
Fig.4 The truss network of morphologic measurement of *S. aureovittata*

- 1: 吻端起点; 2: 过眼睛中点垂直线与背部边缘交叉点;
 - 3: 过眼睛中点垂直线与腹部边缘交叉点; 4: 第 1 背鳍起点; 5: 胸鳍起点; 6: 腹鳍起点; 7: 第 2 背鳍起点;
 - 8: 臀鳍起点; 9: 第 2 背鳍终点; 10: 臀鳍终点;
 - 11: 尾鳍背部起点; 12: 尾鳍腹部起点
- 1: Starting point of mouth; 2: Junction between the line passing through eye center and dorsal edge; 3: Junction between the line passing through eye center and ventral edge; 4: Starting point of the first dorsal fin; 5: Starting point of pectoral fin; 6: Starting point of ventral fin; 7: Starting point of the second dorsal fin; 8: Starting point of anal fin; 9: Ending point of the second dorsal fin; 10: Ending point of anal fin; 11: Starting point of dorsal tail fin; 12: Starting point of ventral tail fin

利用通径分析方法,分析了黄条鲷 11 个形态性状对体重的影响程度。结果显示,体高(BH)和体长(SL)对体重(BW)的影响较大,其通径系数(直接作用 P_i) (决定系数)分别为 41.34%和 13.11%,而体高与体长分别为 0.643 和 0.362 ($P<0.01$),其对体重的决定程度

表4 黄条鲷形态性状对体重影响的通径分析
Tab.4 Effects of phenotypical traits on body weight of *S. aureovittata* using path analysis

性状 Trait	相关系数(<i>r</i>) correlation coefficient	直接作用(<i>P_i</i>) Direct effect	间接作用 Indirect effect			共线性诊断 Collinearity diagnostics		决定系数 Determination coefficient	
			Σ	BH	SL	Tol	VIF	BH	SL
BH	0.976**	0.643**	0.592	-	0.592	0.264	6.557	0.4134	0.4288
SL	0.953**	0.362**	0.333	0.333	-	0.153	5.874	-	0.1311

(决定系数)分别为 41.34%和 13.11%，而体高与体长对体重的共同决定程度达 42.88%，它们对体重的共同决定程度可达 54.45%，表明体高和体长是影响体重的 2 个主要形态性状。

2.4 内部结构特征

黄条鲷口前位，口裂大，口腔内无尖齿，上下颌骨上分布细密的小骨齿，上颌顶部中间有 1 块呈菱形的肉红色的硬质犁骨，上有细密犁齿，其两侧分布有 2 块三角状硬质腭骨，上有细密腭齿。骨质舌呈钝圆形。口腔与咽腔无明显界限，后端与粗短的食道连接，食道与胃联通。鳃弓两侧各有 4 个，只有第 1 鳃弓具有齿状鳃耙，鳃耙数为 6-9+14-22。脑体积较大，可占体重的 0.05%-0.15%。耳石分布在脑后听囊内，与细长的半规管连接组成膜迷路，构成听觉系统。心脏体积较大，位于腹腔前端和鳃弓腹面的围心腔内。黄条鲷内部结构示意见图 5。

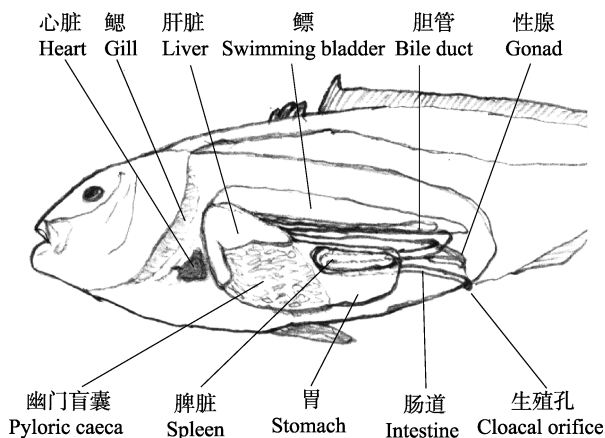


图5 黄条鲷内部结构示意图

Fig.5 The internal anatomy of *S. aureovittata*

黄条鲷胃与口咽腔连接，体积较大，贲门部、幽门部和盲囊部分界明显，摄食后整个胃部呈囊状，可占内脏团体积的 30%以上，食物以玉筋鱼(*Ammodytes personatus*)为主。胃壁较薄，内褶皱较多，外部具有长条状胃盲囊，数量在 120 个左右。肝脏 2 叶，右叶长度和体积大于左叶，包覆于胃的上部。人工养殖鱼

内脏团多被脂肪组织包被，野生鱼脂肪组织相对较少。肠道细长，前端与胃幽门底部联通，后端与泄殖孔联通，比肠长(肠道长/全长)值为 0.62-0.69。肠道有 2 个生理弯曲，在腹腔内呈“之”字形分布，整体包被在内脏的脂肪组织中。胆管细长条状，前端连接肝脏，位于内脏团上方与鳔之间，后端延伸至腹腔末端。脾脏呈长条状，近胃的一端相对钝圆，位于胃的下方，肠道的生理弯曲内。肾脏紧贴脊柱从头部后方向腹腔末端延伸，外面覆盖一层结缔组织膜，其外整体被鳔包围遮盖。鳔体积较大，紧贴脊椎骨从前向后延伸分布，被覆 2 层膜，1 层为结缔组织膜，1 层为白膜，可占腹腔体积的 1/3。性腺 1 对，位于腹腔的后方，呈对称分布，上有血管分布，末端开口于生殖孔。发育的卵巢为黄色，前端可延伸至胃的下方，填充整个内脏腔，将肠道、脾脏等内脏器官包被。

黄条鲷脊椎骨为 23-25 节，净出肉率(去内脏、头部和骨骼重量)可达 75%。

3 讨论

鱼类形态学主要是研究鱼类的外部特征和内部结构，了解各部位结构间的相关关系及机能，分析各器官的原始类型及其发展进化过程(李林春, 2007)。研究并认识目标鱼类的形态性状是进行种质鉴定、分类鉴别与人工养殖技术开发的重要前提(熊邦喜等, 1996)。形态特征是物种多性状的集合，是遗传和环境因素共同作用的产物(Motta *et al*, 1991)。多变量形态度量学方法是基于框架位点而引入多元统计的一种分析方法，可对鱼类外部形态特征进行连续性差异分析(赵峰等, 2011)，其可靠性远高于传统的单性状分析。本研究利用形态度量学方法，测定了黄条鲷 12 个形态性状，并通过其形态性状间的比值分析和计算机模拟等，构建了黄条鲷形态框架图，为今后黄条鲷形态性状快速测定和种质判别提供了依据。黄条鲷是一种大洋性的具有洄游习性的大型鱼类，在全球海洋有多个地理种群分布，且存在同种异名现象，如 *Seriola grandis* Castelnau、*Halatractus dorsalis* Gill、

Seriola zonata Mitchill (刘静等, 2015), 通过对其形态性状的判别和关系分析可建立不同地理群体黄条鲷的身份识别和鉴定技术。同时, 对鲷属鱼类的种间鉴定也具有重要的应用价值。

鱼类生活环境的差异决定了其形态也具有明显的不同, 这是鱼类对环境的一种适应性进化过程。体侧扁且呈梭形或者纺锤形的鱼类, 尾柄粗短而有力, 游泳及加速能力强, 从而能缩短捕食时间, 快速获取食物(Webb, 1984)。黄条鲷也具有粗短的尾柄, 纺锤形体型, 这可能也与其在水中快速游动与觅食的生态习性相适应。生态形态学指出, 鱼类的形态与其生态是相关的, 生态变化与形态变化是动态关系, 这是一种鱼类对环境选择压力的适应(张堂林等, 2008)。如鱼类口裂的相对或绝对大小与食物大小呈正相关, 也与食性呈正相关(Winemiller *et al*, 1995; Piet, 1998)。洄游性的黄条鲷摄食后, 其胃体积和重量约占内脏的1/3, 表明其大体积的胃容量与饵料丰度和获取的季节性和地域性密切相关, 同时也与其口裂、体形等形态特征关系密切。今后应在行为学研究或渔业资源学研究领域对其形态与生态习性的关系进行深入研究和探讨, 为开发其人工繁育技术提供基础资料。

利用统计学方法分析养殖鱼类各性状间关系是进行人工选择育种的重要手段(王新安等, 2013)。其中, 多元分析(相关分析、通径分析、多元回归分析等)是较为常用的统计方法。通过综合考虑多个自变量与因变量的统计学关系, 在多个物种的选择育种研究中取得了较为理想的性状筛选效果, 如利用多元分析建立了红海鲑科鱼类、大西洋鲑鱼(*Salmo salar* L.)等鱼类的体长、体重与体脂肪含量的关系(Kora *et al*, 2000; Dębowski *et al*, 1999), 凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)形态性状对体重的影响(刘小林等, 2004)等。黄条鲷具有生长速度快、肉质鲜嫩的特性, 其肌肉是生鱼片制作的上等材料, 因此, 其体重和出肉率等成为今后选择育种的潜在目标性状。本研究通过相关分析和通径分析, 发现黄条鲷11个形态性状间存在显著的相关性, 并探明了体高和体长是决定体重的2个关键形态性状。今后良种选育过程中可根据本研究结果, 通过形态性状的选择而达到成功选择目标性状的目的, 具有重要的生产应用价值。

耳石是鱼类的听觉器官, 利用耳石上的年轮或者微量元素变化来进行鱼类年龄判别和群体地理划分已在鱼类生态学研究广泛应用(Begg *et al*, 2005)。鱼类耳石的形态特征不但与其遗传特性密切相关, 而且受其生理活动和环境变化等影响较大, 因此, 不同的鱼类群体由于生活史和地理环境的差异可能会具

有种特异性的耳石形态特质(窦硕增等, 2012)。本研究发现, 黄条鲷耳石呈齿状, 其上无法通过打磨等方法观察到形态明显的年轮, 尚不能利用耳石进行有效的年龄鉴定。这可能与其洄游习性及快速生长特性相关。而国外学者利用脊椎骨纵截面纹纹(Shiraishi *et al*, 2010)和耳石微量元素特性(Gillanders *et al*, 2005)鉴定了黄条鲷的年龄, 取得了较好的判别效果, 值得借鉴。

肠道是鱼类的主要消化器官, 直接参与食物的消化与吸收。比肠长是能直观反映鱼类食性的重要指标, 一般肉食性鱼类比肠长较小(<1), 植物食性鱼类比肠长较大(>1), 而杂食性鱼类比肠长最大(毕冰等, 2011)。黄条鲷比肠长为0.62–0.69, 符合肉食性鱼类的特点, 但其肠道较为细长且具有2个生理弯曲, 而胃容量大, 饱食后可占内脏重量的30%以上, 这可能与其应对洄游途中可能出现的短时间食物短缺状况有关。黄条鲷脊椎较为粗大, 与其他鱼类相比, 其脊椎骨节数较少(齐国山等, 2008), 这种形态特征可能与适应其快速游泳习性相关联, 今后可通过行为学方法深入研究。本研究发现, 黄条鲷内脏团多被脂肪组织包围, 特别是人工养殖条件下, 腹腔内脂肪组织几乎可完全包被内脏器官, 这是人工高强度投喂和饵料种类(鲜杂鱼)造成的, 容易造成养殖鱼脂肪肝等问题, 甚至会影响商品鱼肉质(艾庆辉等, 2016)。人工养殖过程中, 应通过调节饵料种类及投喂频率进行体脂肪沉积与代谢的调控, 以提高养殖商品鱼的肌肉品质。

参 考 文 献

- Ai QH, Yan J, Mai KS. Research progresses of lipids and fatty acids transport in fish. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(4): 859–868 [艾庆辉, 严晶, 麦康森. 鱼类脂肪与脂肪酸的转运及调控研究进展. *水生生物学报*, 2016, 40(4): 859–868]
- Begg GA, Campana SE, Fowler AJ, *et al*. Otolith research and application: Current directions in innovation and implementation. *Marine and Freshwater Research*, 2005, 56(5): 477–483
- Bi B, Sun ZW, Mao TQ, *et al*. Relationship between digestive tract structure and feeding habits in common carp, grass carp, silver carp and bighead carp. *Chinese Journal of Fisheries*, 2011, 24(1): 26–29 [毕冰, 孙中武, 毛天强, 等. 鲤、鲢、鳙、草鱼消化道结构与食性的研究. *水产学杂志*, 2011, 24(1): 26–29]
- Dębowski P, Dobosz S, Robak S, *et al*. Fat level in body of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), and Sea trout (*Salmo trutta m. trutta* L.), and method of estimation from morphometric data. *Archives of Polish Fisheries*, 1999, 7(2): 237–243
- Dou SZ, Yu X, Cao L. Otolith shape analysis and its application

- in fish stock discrimination: A case study. *Oceanologica et Limnologia Sinica*, 2012, 43(4): 702–712 [竒硕增, 于鑫, 曹亮. 鱼类矢耳石形态分析及其在群体识别中的应用实例研究. *海洋与湖沼*, 2012, 43(4): 702–712]
- Farré M, Tuset VM, Maynou F, *et al.* Geometric morphology as an alternative for measuring the diversity of fish assemblages. *Ecological Indicators*, 2013, 29(6): 159–166
- Gillanders BM, Joyce TC. Distinguishing aquaculture and wild yellowtail kingfish via natural elemental signatures in otoliths. *Marine and Freshwater Research*, 2005, 56(5): 693–704
- Kora HA, Tsuchimoto MU, Miyata KA, *et al.* Estimation of body fat content from standard body length and body weight on cultured red sea bream. *Fisheries Science*, 2000, 66(2): 365–371
- Li LC. Fish culture biology-fish morphology and function. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2007 [李林春. 鱼类养殖生物学: 鱼类形态与功能. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2007]
- Li SF. Study on genetic characteristics of dominant freshwater cultured fishes in China. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1998 [李思发. 中国淡水主要养殖鱼类种质研究. 上海: 上海科学技术出版社, 1998]
- Liu J, Chen YX, Ma L. Fishes of the Bohai Sea and Yellow Sea. Beijing: Science Press, 2015, 172 [刘静, 陈咏霞, 马琳. 黄渤海鱼类图志. 北京: 科学出版社, 2015, 172]
- Liu XL, Wu CG, Zhang ZH, *et al.* Mathematical analysis of effects of morphometric attributes on body weight for *Penaeus vannamei*. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(4): 857–862 [刘小林, 吴长功, 张志怀, 等. 凡纳对虾形态性状对体重的影响效果分析. *生态学报*, 2004, 24(4): 857–862]
- Motta PJ, Kotschal KM. Correlative, experimental, and comparative evolutionary approaches in ecomorphology. *Netherlands Journal of Zoology*, 1991, 42(2–3): 400–415
- Piet JG. Ecomorphology of a size-structured tropical freshwater fish community. *Environmental Biology of Fishes*, 1998, 51(1): 67–86
- Qi GS, Li D, Chen SQ, *et al.* Morphological characteristics and internal structure of *Platichthys stellatus* Pallas. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(1): 1–11 [齐国山, 李迪, 陈四清, 等. 星突江鲮的形态特征及内部结构研究. *中国水产科学*, 2008, 15(1): 1–11]
- Shiraishi T, Ohshimo S, Yukami R. Age, growth and reproductive characteristics of gold striped amberjack 1 *Seriola lalandi* in the waters off western Kyushu, Japan. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 2010, 44(2): 117–127
- Wang XA, Ma AJ, Xu K, *et al.* Relationship between morphometric attributes and body weight in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*. *Acta Zoologica Sinica*, 2008, 54(3): 540–545 [王新安, 马爱军, 许可, 等. 大菱鲆幼鱼表型形态性状与体重之间的关系. *动物学报*, 2008, 54(3): 540–545]
- Wang XA, Ma AJ, Zhuang ZM, *et al.* Effects of morphometric attributes on body weight of *Takifugu rubripes* (Temminck et Schlegel). *Oceanologica et Limnologia Sinica*, 2013, 44(1): 135–140 [王新安, 马爱军, 庄志猛, 等. 红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)形态性状对体重的影响效果. *海洋与湖沼*, 2013, 44(1): 135–140]
- Webb PW. Body form, locomotion and foraging in aquatic vertebrates. *American Zoologist*, 1984, 24(1): 107–120
- Winemiller KO, Kelso-Winemiller LC, Brenkert AL. Ecomorphological diversification and convergence in fluvial cichlid fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 1995, 44(1): 235–261
- Xiong BX, Chen ZF, Gao Y, *et al.* Study on correlation between age and growth of fishes with different body shape. *Reservoir Fisheries*, 1996(5): 22–26 [熊邦喜, 陈志奋, 高云, 等. 不同体形鱼类的年龄与生长相关表达式的拟合研究. *水利渔业*, 1996(5): 22–26]
- Xiong Y, Zhang M, Zhang H, *et al.* Preliminary research on relationship between fish functional morphology and trophic position. *Journal of Lake Science*, 2015, 27(3): 466–474 [熊鹰, 张敏, 张欢, 等. 鱼类形态特征与营养级位置之间关系初探. *湖泊科学*, 2015, 27(3): 466–474]
- Zhang CL. Survey report on fishes of the Bohai Sea and Yellow Sea. Beijing: Science Press, 1955, 116–119 [张春霖. 黄渤海鱼类调查报告. 北京: 科学出版社, 1955, 116–119]
- Zhang TL, Li ZJ, Cao WX. Advances in studies on the ecomorphology of fish. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(1): 152–160 [张堂林, 李钟杰, 曹文宣. 鱼类生态形态学研究进展. *水产学报*, 2008, 32(1): 152–160]
- Zhao F, Ma CY, Zhuang P, *et al.* Morphological variation and phylogenetic relationship among *Pampus* fishes in East China Sea. *Marine Fisheries*, 2011, 33(2): 138–143 [赵峰, 马春艳, 庄平, 等. 东海常见鲷属鱼类的形态差异及系统进化关系探讨. *海洋渔业*, 2011, 33(2): 138–143]

(编辑 马瑾艳)

Morphometric Analysis and Internal Anatomy of Yellowtail Kingfish (*Seriola aureovittata*)

LI Rong¹, XU Yongjiang^{2,3}, LIU Xuezhou^{2,3}^①, SHI Bao^{2,3}

(1. Dalian Fugu Fishery Co. Ltd., Dalian 116400; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

Abstract Yellowtail kingfish, *Seriola aureovittata*, is a globally distributed marine pelagic fish species, and is of great economic importance all over the world. Many countries including China has launched the artificial culture of this species due to its fast growth, nutritional value and market value. The biological characteristics are basic knowledge for aquaculture biology and especially for taxonomy and evolutionary ecology. To understand the biological characteristics of *S. aureovittata*, both external morphological traits and internal anatomy were investigated by using traditional, morphometric, anatomical and statistical measurement methods. The truss network of *S. aureovittata* was constructed by computer simulation. The morphology of otolith and scale was described. Calculating the ratios between morphological traits, suggested the ratios of total length (TL)/soma length (SL), lower jaw length (LJL)/upper jaw length (UJL), peduncle length (PL)/peduncle distance (PD) were closely correlated. The mathematical correlation models between TL, body height (BH) and body weight (BW) were calculated with the formulas: $BW=2.1652TL^2-140.35TL+2479.9$ ($R^2=0.9812$) and $BW=0.7575SL^{3.0059}$ ($R^2=0.9816$). The correlation analysis showed that 11 morphological traits were significantly correlated except for the eye diameter (ED). The path analysis indicated that BH and SL were main factors affecting BW, with the determining coefficient of 41.34% and 13.11%, respectively, and the synergistic determining coefficient was 42.88%. The internal structure was also described. For *S. aureovittata*, the ratios of intestine length/total length were between 0.62 and 0.69, and the vertebra number was between 23 and 25. Furthermore, total meat yield could achieve 75% of BW. Our results provided the morphometric tools for species identification, systematic taxonomy, breeding and aquaculture production of *S. aureovittata*.

Key words *Seriola aureovittata*; Morphological traits; Morphometric identification; Internal anatomy

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) 消化道显微与超微结构*



李 斌^{1,3} 柳学周^{1,2①} 徐永江^{1,2} 史 宝^{1,2} 朱学武^{1,3}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学
与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 采用解剖学、组织切片、电镜观察和 2 种染色技术研究了半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)消化道的组织结构特征。半滑舌鳎消化道可分为口咽腔、食道、食道胃、前肠、后肠 5 部分,观察了各部分消化道的显微和超微结构,测定了消化道各部分的黏膜褶皱数、黏膜褶皱高度、肌肉层(纵肌和环肌)厚度、黏液细胞相对密度等指标。结果显示,半滑舌鳎不具备结构特征明显的胃,摄食后,食道后部与肠道连接部形成一个囊状膨大结构,称之为食道胃;食道前部开始出现杯状黏液细胞,整个食道以Ⅲ型黏液细胞为主,食道胃中黏液细胞以Ⅲ型为主,前肠黏液细胞以Ⅳ型为主,后肠黏液细胞以Ⅱ型为主。研究结果为认识半滑舌鳎消化与吸收生理机制及研制人工养殖用饲料提供参考资料。

关键词 半滑舌鳎; 消化道; 食道胃; 黏液细胞; 组织学

中图分类号 S965 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0150-09

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)属鲽形目(Pleuronectiformes)、舌鳎科(Cynoglossidae)、舌鳎属(*Cynoglossus*),是东北亚大型名贵经济鱼类,在我国近海底层广泛分布,生长速度快,肉质鲜美,深受消费者喜爱。目前,半滑舌鳎人工养殖技术已较为成熟,养殖产业规模发展迅速(柳学周等, 2005)。鱼类消化系统在机体新陈代谢过程中发挥着重要作用,是鱼类消化和营养吸收的主要场所,还具有重要的内分泌功能,对其形态和结构的研究是揭示鱼类摄食、消化和吸收等生理机制的基础和重要途径,也是人工配合饲料研制开发的重要前提。近年来,章龙珍等(2010)、陈慕雁等(2006)、胡玲玲等(2010)分别对长鳍篮子鱼(*Siganus canaliculatus*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)的消化系统进行了不同水平的研究,探明了其消化系统的结构特征,为其人

工养殖的饲料研发和养殖业发展提供了理论支撑。然而,对于半滑舌鳎消化系统的研究,仅见常青等(2005)关于半滑舌鳎 1-30 d 仔稚鱼消化系统发生的组织学进行过报道,半滑舌鳎成鱼消化道形态和结构方面的研究尚未见报道。本文系统研究了半滑舌鳎成鱼消化道组织结构特征,并探讨了其可能的生理机能,旨在为全面认识半滑舌鳎消化生理机制和研制高效专用配合饲料提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 实验鱼来源

实验用鱼于 2014 年 10 月取自山东青岛市忠海水产有限公司养殖成体半滑舌鳎,挑选体表无伤、体色正常、游动活泼、摄食积极的个体用于实验。实验鱼

* 国家自然科学基金(31502145)、国家鲆鲽类产业技术体系项目(CARS-50)和国家国际科技合作专项(2013DFA31410)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31502145), China Agriculture Research System (CARS-50) and International S&T Cooperation Program of China (2014DFA31410)]. 李 斌, E-mail: lb3702@163.com

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-11-05, 收修改稿日期: 2016-01-13

使用数量为 30 尾, 实验鱼体重为 (110.955 ± 14.954) g, 体长为 (22.662 ± 3.663) cm。取样前, 所有实验鱼停食 12 h。

1.2 组织学观察

取 30 尾实验鱼用于消化道的数量性状测量和组织学结构观察。取样前, 实验鱼以 300 mg/L 的 MS-222 麻醉, 用直尺和电子台秤测量实验鱼全长(TL)和体重(TW)。解剖开腹腔, 观察消化系统各部分的形态特征。之后, 迅速取出消化道, 测量肠道长度(IL)用于计算肠道系数 $(IC=IL/TL)$, 并测量肠道重量(GW)、肝胰脏重量(LPW), 用于计算比肠重 (GW/TW) 、比肝胰脏重 (LPW/TW) 。

取实验鱼的食道、前肠、后肠组织块, 以 Davison 固定液固定后转入 70% 酒精中保存。组织样品经 70%–100% 酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 横向做连续切片(厚度为 6–7 μm), 苏木精–伊红(HE)染色后进行组织学观察。使用 NIKON 80i 型显微镜观察并拍照, 利用系统自带标尺系统进行测量和标记。参照邓振旭等(2008)的研究方法, 利用阿利新蓝–过碘酸雪夫氏染色法(AB-PAS, pH=2.5)对半滑舌鳎消化道各部分进行组织化学染色以显示黏液细胞。

1.3 电镜观察

取 10 尾实验鱼用于电镜观察, 实验鱼以 300 mg/L 麻醉剂 MS-222 麻醉处死, 解剖取样肠道与食道连接处(食道胃)、肠道前部和后部, 将各个组织样品块迅速置入 2.5% 戊二醛中以手术刀切取约 1 mm^3 的小组织块, 固定于 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 2.5% 戊二醛中, 用于扫描电镜和透射电镜观察。

扫描电镜样品制备: 将样品置于 2.5% 戊二醛中 4 $^{\circ}\text{C}$ 预固定 24 h, 之后用磷酸缓冲液(pH=7.2)冲洗 3 次, 每次 20 min, 再以 1% 锇酸固定 1 h, 磷酸缓冲液冲洗, 然后用 30%–100% 的乙醇梯度脱水, 每个浓度梯度脱水 10–15 min, 临界点干燥器内以干冰干燥, 喷金镀膜。使用 JSM-840 型(JEOL, 日本)扫描电镜观察。

透射电镜样品制备: 将样品置于 2.5% 戊二醛中 4 $^{\circ}\text{C}$ 预固定 24 h, 之后用 PBS 缓冲液冲洗 3 次, 每次 20 min, 再以 1% 锇酸固定 1 h, PBS 缓冲液冲洗, 然后用 30%–100% 的丙酮梯度脱水, 每个浓度梯度脱水 10–15 min, 最后用 Epon812 环氧树脂包埋、定位, 半薄切片以甲苯胺蓝、醋酸双氧铀硝酸铅染色。使用 JEM-1200EX 透射电镜(JEOL, 日本)观察。

1.4 数据统计分析

消化道各部分黏膜褶皱数、黏膜褶皱高度、肌肉层(纵肌和环肌)厚度、黏液细胞相对密度等指标作为

测量依据。黏膜褶皱数为消化管横切面上黏膜褶皱的个数; 黏膜层褶皱高度为黏膜褶皱顶端至基部凹陷处的垂直距离; 细胞的相对密度是在视野中采用曲线测量工具及计数软件统计 100 μm 长度的上皮中细胞的平均数量, 每个指标均取 10 个来自不同样本相同组织的平均值, 采用 IPP 图像分析软件(MEDIA CYBERNETICS 公司, 美国)分析所获得的测量数据。

本研究中所有数据表示为平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD), 实验结果以单因素方差分析(One-way ANOVA)统计差异显著性, 使用 SPSS16.0 统计软件, 设定差异显著性指数 P 为 0.05, 当 $P < 0.05$ 时为差异显著, 反之差异不显著。

2 结果

本研究中测量了 30 尾半滑舌鳎的体长、肠长、体重、肠重、肝胰脏重和内脏团重, 并计算半滑舌鳎消化道指数, 其中, 比肠长为 (0.763 ± 0.291) 、比肠重为 (0.0097 ± 0.0010) 、比肝胰脏重为 (0.014 ± 0.0052) 、比内脏重为 (0.083 ± 0.017) 。

2.1 消化道形态特征

半滑舌鳎的消化道可明显地划分为口咽腔、食道、食道胃、前肠、后肠共 5 部分, 未见有形态上明显的胃。半滑舌鳎口下位, 口咽腔小, 口裂半月形, 有眼侧两颌无齿, 无眼侧两颌细绒毛状齿, 呈窄带状排列, 无犁骨牙和颞骨牙, 鳃耙退化为细小尖突; 有咽喉齿且较为发达, 有舌, 口咽腔后为食道, 连接口咽腔和食道胃, 较短, 长度仅为消化道长度的 1/15 左右。饱食的半滑舌鳎在食道后方形成 1 个临时贮存食物的食道胃(图1), 形态上与食道分界较明显, 往后延伸逐渐变细, 与前肠分界不明显, 颜色也无明显差异。进食消化完成后食道胃明显变小, 长度和直径与肠道无差异。前肠和后肠的直径和颜色均略有差异, 前肠直径较后肠略大, 偏乳白色, 后肠近肛门处直径变大, 肠壁变薄。

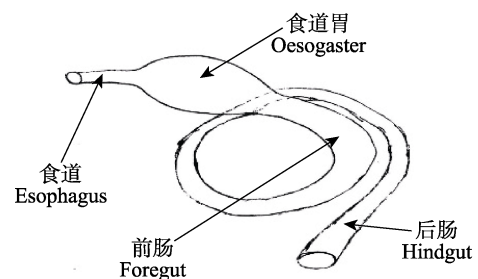


图 1 半滑舌鳎消化道外部形态特征示意
Fig.1 The schematic diagram of external morphology of *C. semilaevis* alimentary canal

2.2 消化道组织学特征

食道：组织切片观察显示，食道组织分为4层(图2-1)，由内向外依次为黏膜层、黏膜下层、肌肉层和浆膜层。食道黏膜层向食道内侧突起形成11-14条纵行褶皱(图2-2)，为黏膜褶皱，平均高度为 $(755.333 \pm$

$95.254) \mu\text{m}$ (表1)，食道前、中、后各部分黏膜褶皱形态差异很大，前部褶皱宽大，分支较多，后部逐渐变窄，分支减少直至消失。黏膜层表皮中主要细胞类型为单层柱状上皮细胞，细胞排列紧密，细胞核位于柱状细胞基底部，食道各部黏膜层表皮厚度和上皮细胞组成

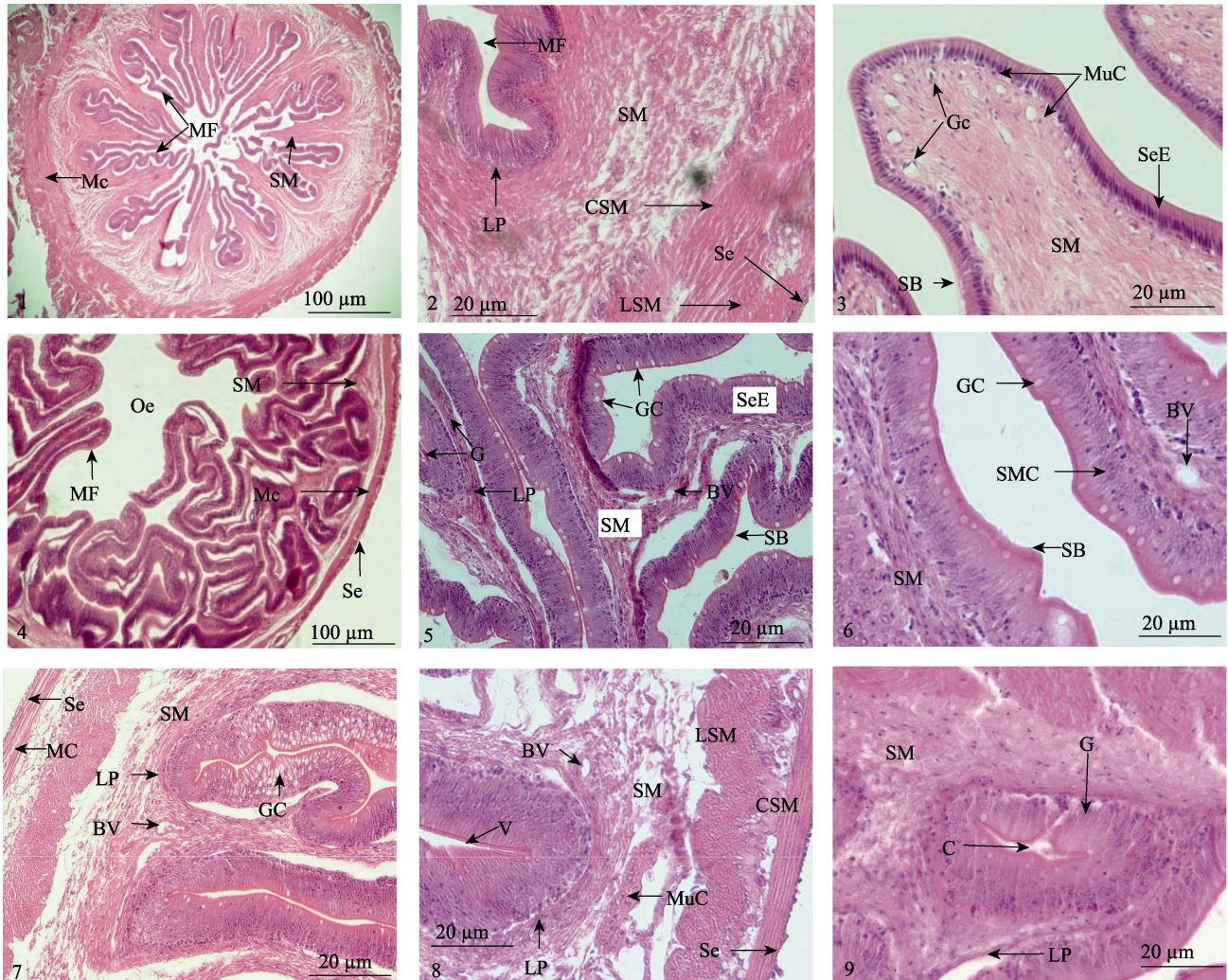


图2 半滑舌鲷消化道结构显微观察

Fig.2 Microscopic observation of the digestive tract of *C. semilaevis*

- 1: 食道横切整体; 2: 食道内壁横切; 3: 食道前部黏膜褶皱横切; 4: 食道-食道胃连接处横切; 5: 食道胃横切;
6: 食道胃黏膜褶皱横切; 7: 前肠横切; 8: 后肠横切; 9: 腺体横切

1: Intergral transverse section of oesophadus; 2: Transverse section of oesophadus inner wall; 3: Transverse section of oesophadus mucosa fold; 4: Transverse section of junction between oesophadus and oesogaster; 5: Transverse section of oesogaster; 6: Transverse section of oesogaster mucosa fold; 7: Transverse section of foregut; 8: Transverse section of hind gut; 9: Transverse section of gland

MF: 黏膜褶皱; Mc: 肌层; SM: 黏膜下层; LP: 固有膜; Se: 浆膜; LSM: 纵肌; CSM: 环肌;
SB: 纹状缘; SeE: 单层柱状上皮; Gc: 杯状细胞; MuC: 黏液细胞; Oe: 食道; G: 腺体; BV: 血管;
SMC: 表面黏液细胞; V: 微绒毛; C: 腺体腔

MF: Mucosa fold; Mc: Muscular coats; SM: Submucosa; LP: Lamina propria; Se: Serosa; LSM: Longitudinal layers of striated muscle; CSM: Circular layers of striated muscle; SB: Striated border; SeE: Single-layered columnar epithelium; Gc: Goblet cell; MuC: Mucous cell; Oe: Oesophagus; G: Glands; BV: Blood vessel; SMC: Surface mucous cell; V: Villus; C: Cavity

均有差异(图2)。食道前部黏膜层表皮为单层柱状上皮细胞(图 2-5), 经 HE 和 AB-PAS 染色可见少量形态单一的黏液细胞; 食道中后部上皮变厚, 经 HE 和 AB-PAS 染色明显可见 3 种不同类型的黏液细胞(图 2-3)。食道黏膜上皮顶端可见纹状缘(图 2-5), 但食道前部纹状缘不明显(图 2-4), 食道中部以后明显可见。固有层是黏膜层的组成结构之一, 由致密结缔组织构成, 黏膜下层由疏松结缔组织构成(图 2-2), 固有层和黏膜下层分界不明显(图 2), 均含有丰富的血管和神经, 食道后部固有层和黏膜下层内可见少量食道腺(图 2-6); 食道肌肉层很厚, 为横纹肌, 前部以环肌为主, 偶见纵肌, 食道后部才出现稳定的内部环肌和外部纵肌的结构, 总厚度达(226.345±26.192) μm (表 1), 内环肌较厚(图 2-2); 浆膜层处于最外侧, 由少量的疏松结缔组织及外侧间皮组成, 易脱落(图 2-2)。

食道胃: 半滑舌鳎没有结构明显的胃, 即在组织学上没有典型的胃特征出现。进食后, 食道后方与肠道前端连接处明显膨大, 形成 1 个暂时贮存食物的食道胃, 而在饥饿状态时食道胃明显缩小, 甚至消失。组织学观察发现(图 2-4), 该部位也由黏膜层、黏膜下层、肌肉层和浆膜层共 4 层构成。与食道相比, 肌肉层和黏膜下层明显变薄, 环肌层变化幅度较大, 黏膜

褶皱变得细长, 黏液细胞数量增多。黏膜层向内腔突起形成纵行褶皱, 横向切片显示, 黏膜褶皱呈长舌状突起, 在整个消化道中数量最多, 达到 19–22 个(表 1), 高度也最大, 达到(1232.333±239.414) μm (表 1)。黏膜上皮为单层柱状上皮, 由柱状细胞和黏液细胞组成, 柱状细胞排列整齐, 细胞核位于中部或基部, 黏液细胞间插在柱状细胞之间, 形状不一, 有杯状、球状、梨状等, 相对密度为(2.733±0.213)个/100 μm (表 1), 与肠道前部黏液细胞相对密度没有差异, 但比肠后部黏液细胞要少($P < 0.05$)。黏膜上皮表面纹状缘明显。固有层和黏膜下层均分布有腺体, 腺体大小不一, 部分腺腔面可见黏液细胞, 表面腺细胞较大, 基底部含大量体积较小的圆形腺细胞, 与食道后部和肠道各部分相比, 该部位腺体除数量上有所增加外, 结构上未见差异。固有层和黏膜下层中分布有大量血管和神经, 固有层中血管较细, 以毛细血管为主, 而黏膜下层血管较粗大。此部位肌肉层很薄, 但可明显分为环肌和纵肌, 内层环肌厚度为(43.109±5.525) μm (表 1), 与肠道环肌差异不显著($P < 0.05$)。外层纵肌稍薄, 为(26.255±4.077) μm (表 1), 比肠道前部纵肌层稍厚, 比肠后段薄, 差异极显著。最外层浆膜可见血管, 与食道浆膜层结构上无差异。

表 1 半滑舌鳎幼鱼消化道各部分指数

Tab.1 Morphological index of each segment of *C. semilaevis* alimentary canal ($n=30$)

项目 Items	食道 Esophagus	食道胃 Oesogaster	前肠 Foregut	后肠 Hindgut
黏膜褶皱数 Number of mucosal folds (个)	12.330±1.014 ^a	20.420±1.114 ^a	15.800±1.418 ^b	15.800±0.814 ^b
黏膜褶皱高 Height of mucosal folds (μm)	755.250±95.255 ^a	1232.333±239.741 ^a	885.627±247.139 ^b	702.378±215.281 ^b
环肌层厚 Thickness of circular muscle (μm)	226.344±26.192 ^a	43.109±5.525 ^a	49.223±5.667 ^b	44.277±4.518 ^a
纵肌层厚 Thickness of longitudinal muscle (μm)		26.255±4.077 ^a	21.779±2.956 ^a	38.722±6.922 ^b
黏液细胞密度 Density of mucus cells (cells/100 μm)		2.733±0.213 ^a	2.667±0.152 ^a	3.221±0.119 ^b
微绒毛长 Length of microvillus (μm)		1.401±0.042 ^a	2.125±0.093 ^b	1.655±0.050 ^a

注: 不同的字母表示差异显著($P < 0.05$)

Note: Different letters indicated significant differences ($P < 0.05$)

肠道: 肠道基本结构也由 4 层构成, 分别为黏膜层、黏膜下层、肌肉层和浆膜层。肠道黏膜褶皱数量相对减少(14–18 个), 肠前部和后部之间没有差异, 高度由前到后逐渐降低, 单层柱状黏膜上皮细胞排列紧密, 黏液细胞丰富, 肠后部含量多达(3.221±0.119)个/100 μm , 与肠前部差异显著($P < 0.05$)(图 2-7); 前肠肌肉层厚度与囊状膨大结构没有显著性差异($P > 0.05$), 但到肠道后部纵肌层明显变厚(图 2-8), 为(38.722±6.922) μm , 达到最大; 固有层和黏膜下层中, 肠前部腺体仍然较多, 到肠后部腺体极少见到, 其他结构与囊状膨大结构基本一致。

2.3 食道胃和肠道超微结构

扫描电镜观察: 食道胃和肠道各部位表面结构差别不大(图 3)。在低倍镜($\times 2000$)下, 黏膜褶皱整体纵向排列, 不整齐, 顶端较窄, 各段无明显差别。褶皱表面密布微绒毛, 排列紧密, 长短均一。食道胃和前肠细胞界限明显, 细胞大部分呈多角形, 还有部分呈圆形, 圆形的较小, 部分细胞交界处有分泌孔, 可见分泌物; 肠道后段细胞界限模糊, 分泌孔数量增大。扫描电镜下还可见腺体开口(图 3-2), 内壁和开口处无绒毛。

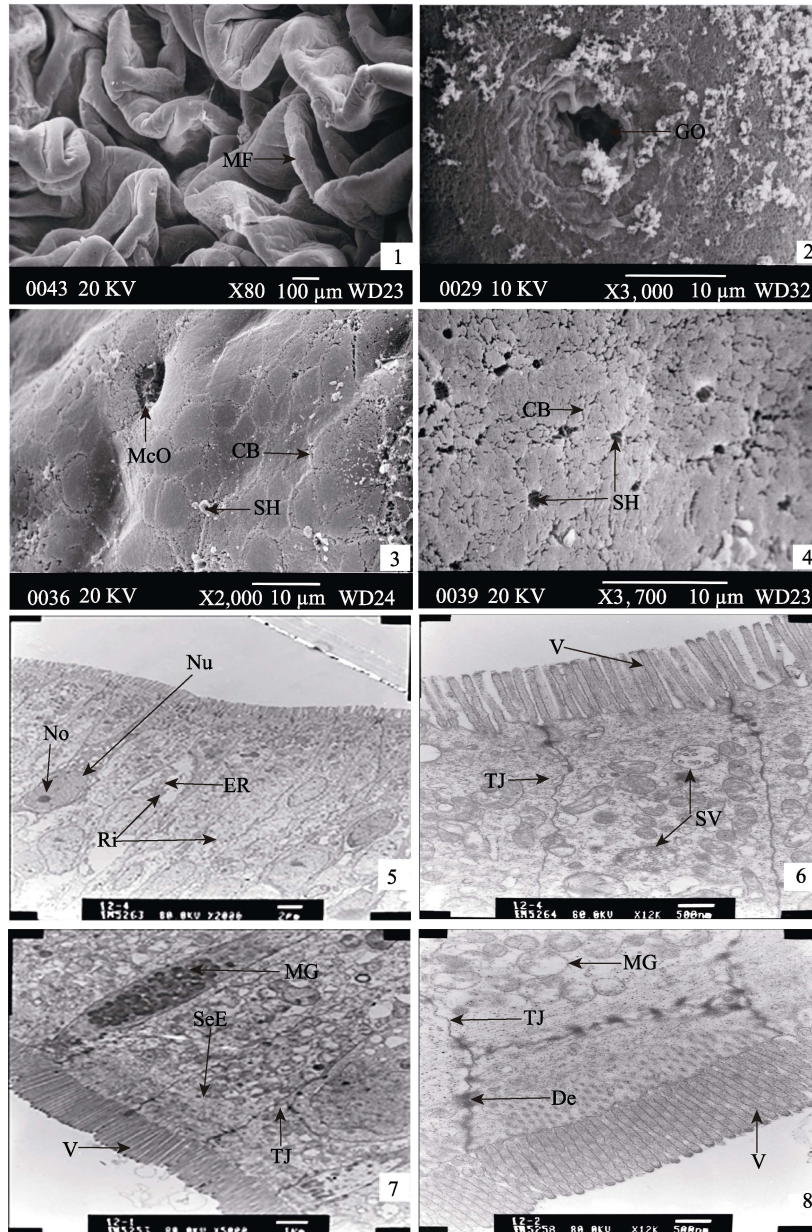


图 3 半滑舌鲷消化道结构超微观察

Fig.3 Microscopic observation of the digestive tract of *C. semilaevis*

扫描电镜：1：黏膜褶皱；2：腺体开口；3：前肠；4：后肠

透射电镜：5：肠黏膜上皮；6：食道胃黏膜上皮；7：前肠；8：后肠

Picture 1-4 were observed with scanning electron microscopy, Picture 5-8 were observed with transmission electron microscopy

MF: 黏膜褶皱; GO: 腺体开口; CB: 细胞界限; McO: 黏液细胞开口; SH: 分泌孔; Nu: 细胞核; No: 核仁; ER: 内质网; Ri: 核糖体; TJ: 紧密连接; SV: 含分泌颗粒的分泌泡; V: 微绒毛; SeE: 单层柱状上皮; MG: 黏原颗粒; De: 桥粒

MF: Mucosa fold; GO: Gland openings; CB: Cell boundaries; McO: Mucous cell openings; SH: Secretion hole; Nu: Nucleus; No: Nucleolus; ER: Endoplasmic reticulum; Ri: Ribosomal; TJ: Gastric epithelial: tight junctions; SV: Secretory vesicles; V: Villus; SeE: Single-layered columnar epithelium; MG: Mucous granules; De: Desmosomes

透射电镜观察：各部分黏膜上皮有黏液细胞，表面可见微绒毛(图 3-7)，各部分微绒毛形态上无差异，

但高度不同，前肠部最高，与食道胃和肠后部存在显著性差异($P < 0.05$)。吸收细胞呈高柱状，细胞核位于

中部或基底部, 椭圆形, 被染色较浅, 球形核仁被染成深色, 明显可见(图3-5)。细胞内含有丰富的线粒体、溶酶体、内质网等细胞器, 内质网主要分布于细胞核周围, 其他细胞器和分泌颗粒在细胞质上部分布密集。相邻细胞间尚可见紧密连接和中间连接、桥粒等(图3-6), 肠后部尤其丰富。黏液细胞大小和形状不同, 顶部胞质内含大量黏原颗粒(图3-9), 表面微绒毛变短, 向内凹陷, 紧促在一起。

2.4 消化道黏液细胞数量分布特点

根据 AB-PAS 染色结果的不同, 参照邓振旭等(2008)和尹苗等(2000)的分类方法, 将消化道黏液细胞分为 3 种类型: II 型, 染色呈蓝色, AB 阳性, 含有酸性黏多糖; III 型, 染色呈紫红色, 主要含有 PAS 阳性的中性黏多糖, 同时含有少量 AB 阳性的酸性黏多糖; IV 型, 染色呈蓝紫色, 主要含有 AB 阳性的酸性黏多糖, 同时含有少量 PAS 阳性的中性黏多糖。消化道切片经 AB-PAS(pH 为 2.5)染色后观察见图 4。从图 4 可以看出, 消化道内黏液细胞大小不一, 形状各

异, 有杯型、球型、梨型、椭圆型等, 黏膜褶皱顶端和底部上皮中黏液细胞差异较大, 顶端黏液细胞含量较多, 体积相对较大, 底部黏液细胞数量减少, 体积也变小。各分段部位黏液细胞的类型和分布也均有差异。

食道: 食道各部分 AB-PAS 染色结果显示, 食道前部仅发现杯状黏液细胞, 食道中部黏液细胞形态和数量增多, 到食道后部单层柱状上皮中明显可见 II 型、III 型和 IV 型黏液细胞(图 4-1), 其中, III 型黏液细胞最多, 占 75%, II 型黏液细胞次之, IV 型黏液细胞极少, 纹状缘呈紫红色。

食道胃: AB-PAS 染色结果显示, 食道胃单层柱状上皮细胞中黏液细胞的数量明显增加, 含有 II 型、III 型和 IV 型黏液细胞(图 4-2)。III 型黏液细胞所占比例达 90%, 含少量 II 型和 IV 型黏液细胞。可见半滑舌鳎食道胃黏液细胞主要含中性黏多糖, 并含少量酸性黏多糖。

肠道: AB-PAS 染色结果显示, 肠前部和后部均含有大量黏液细胞, 同样含有 II 型、III 型和 IV 型黏液细胞(图 4-3)。与食道胃相比, 整个肠道的 III 型黏液细

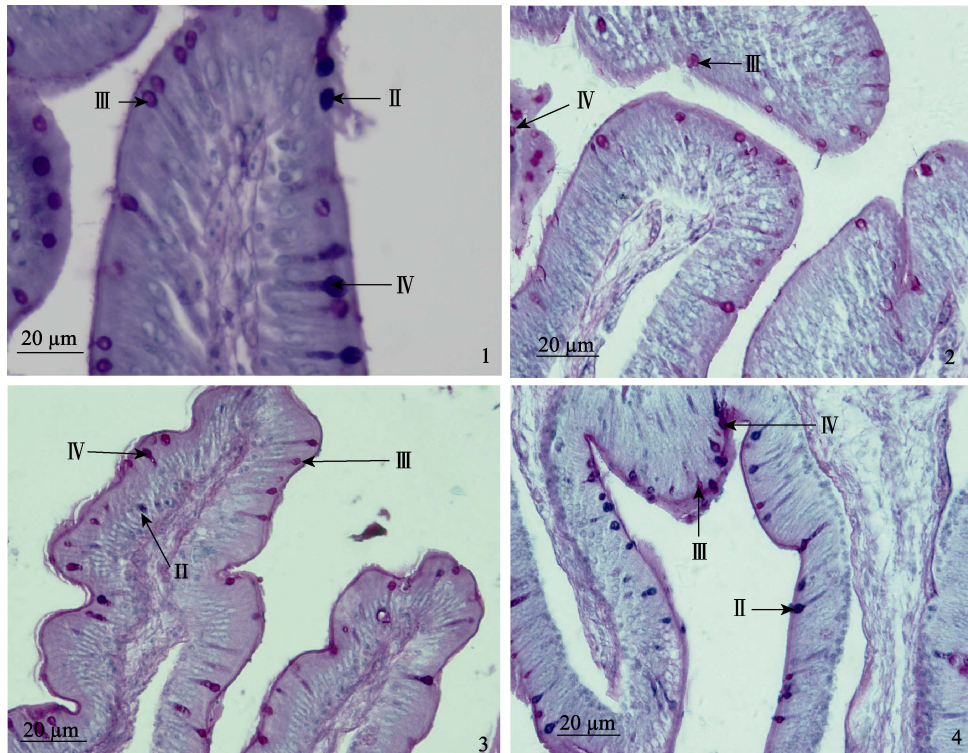


图 4 半滑舌鳎消化道内黏液细胞类型与分布

Fig.4 Type and distribution of mucous cells in digestive tract of *C. semilaevis*

1: 食道后部横切; 2: 食道胃顶部横切; 3: 前肠横切; 4: 后肠横切;

II 型黏液细胞呈蓝色; III 型黏液细胞呈紫红色; IV 型黏液细胞呈蓝紫色

1: Transverse section of hind esophagus; 2: Transverse section of top oesogaster;

3: Transverse section of foregut; 4: Transverse section of hindgut

Type II mucous cells is blue; Type III mucous cells is purple; Type IV mucous cells is blue-purple

胞的比例减少近 50%，Ⅱ型和Ⅳ型黏液细胞比例增加近 80%。肠道前部主要以Ⅲ型和Ⅳ型黏液细胞为主，Ⅳ型黏液细胞稍多，含少量Ⅱ型黏液细胞。肠道后部以Ⅱ型和Ⅳ型黏液细胞为主，Ⅱ型黏液细胞居多，Ⅲ型黏液细胞含量最少(图4-4)。说明肠道黏液细胞中含有中性黏多糖和酸性黏多糖。

3 讨论

本研究首次系统观察了半滑舌鲷成鱼消化道的形态学和组织学结构特征，对存在争议的“胃”进行定性分析，并对黏液细胞在消化道内的分布进行了定性和定量分析，为深入认识半滑舌鲷的消化生理特性提供了基础资料。

半滑舌鲷为底栖鱼类，食性广，对食物的软硬程度非常敏感。比肠长最能够直观地反应鱼类的食性(王晓伟等, 2008)。毕冰等(2011)研究认为，肉食性鱼类的比肠长小于 1，杂食性或草食性鱼类的比肠长都大于 1，本研究中比肠长指数为(0.763±0.291)，说明其肉食性的特点。此外，本研究发现，半滑舌鲷整个食道的黏液分泌量相对较少，这可能是导致半滑舌鲷对食物软硬程度敏感的因素之一。半滑舌鲷消化道黏膜上皮较薄，多为单层柱状上皮，利于快速消化吸收；食道中后部上皮细胞游离面开始出现明显的纹状缘，在很大程度上增大了吸收面积，提高了消化道消化吸收效率，这与刘飞等(2011)对新型三倍体湘云鲫(*Carassius auratus*)、湘云鲤(*Cyprinus carpio*)的研究结果一致。

食道末端与肠道前端的连接部位，迄今为止还没有统一的名称，Becker 等(2010)、Jaroszevska 等(2008)和 Ikpegbu 等(2013)分别在其相关研究中称之为膨大部、过渡区和食道胃，通过对该部位的切片染色观察，本研究认为，称之为食道胃较为合适。食道胃与口腔、食道、前肠、后肠组成完整的消化道，而这种分段方式与 Ribeiro 等(2001)对塞内加尔鲷(*Solea senegalensis*)消化道的分段方式基本一致。形态学观察显示，食道胃在半滑舌鲷进食前后差别很大，饥饿状态下食道胃变小甚至消失，饱食状态下食道胃长度可扩大 2-3 倍，甚至可延伸至肠道中部。显微结构观察显示，半滑舌鲷食道胃的肌肉层相对较薄，但可以清楚地观察到横纹肌，很大程度上增加了食道胃的韧性，适于扩张，这可能与暂存食物的生理功能相适应；食道胃的黏膜褶皱发达，黏膜上皮可见纹状缘，增加了食道胃与食物的接触面积，这可能与食物的进一步消化吸收有关，甚至与前肠一起行使主要的消化吸收功能。光镜和电镜下均可见食道胃不同区域黏膜上皮

和腺体的组织结构及组化反应特性基本一致，与消化道的其他部分相比差异性不明显；未观察到典型的胃小凹结构，没有典型的胃的特征，这与西伯利亚鲷(*Acipenser baerii*) (陈宁宁等, 2011)、香鱼(*Plecoglossus altivelis*) (卢明明等, 1999)、长鳍篮子鱼(*Siganus canaliculatus*) (Ribeiro *et al*, 1999)等有胃鱼的胃小凹结构不同，但与 Arellano 等(2001b)对塞内加尔鲷成鱼的研究结果一致。Arellano 等(2001a)研究显示，在该部位没有检测到羧酸盐或者硫酸盐的存在，并且酸性黏多糖含量很低，不符合胃的特征。综上所述，本研究结果显示，半滑舌鲷成鱼没有真正意义上的胃。常青等(2005)、万瑞景等(2004)对半滑舌鲷仔稚鱼的相关研究中指出，仔鱼前期已经形成胃，而在对半滑舌鲷成鱼的研究中没有发现真正意义上的胃，这种差异可能与半滑舌鲷不同生长阶段对生活环境的适应机制相关，其真正的原因有待进一步研究。

Sinha 等(1975)研究表明，鱼类消化道黏液细胞的种类和数量与其食性、摄食方式、食物颗粒大小、生活环境和生理功能有着密切的关系。黏液细胞主要分布在鱼类皮肤和消化道的上皮中，通过分泌大量的黏液发挥重要的作用(Bovic *et al*, 2001; Arellano *et al*, 2001a)，(1) 润滑作用：分泌到体表可以减少体表与水的摩擦，分泌到消化道内可以润滑消化道和食物，避免摄入食物过程中的机械损伤；(2) 辅助消化吸收作用：分泌物中的黏多糖类能够促进食物的消化吸收；(3) 阻止自身蛋白水解以及对集约化养殖压力的适应性应答，在鱼类饥饿状态下，黏液细胞会增殖；(4) 免疫作用：黏液中富含溶菌和杀菌物质，能够有效阻止病原菌的侵害。本研究结果显示，半滑舌鲷在食道前部以杯状黏液细胞为主，其内的中性黏多糖在 HE 染色时，被水溶解而显示透明的空泡状，分泌黏液的主要作用可能是包裹最初摄入的食物以及润滑食道，避免摄入的食物对内壁造成损伤，对食物进行初步消化；食道中部以Ⅱ型黏液细胞为主，富含酸性黏多糖，分泌黏液的主要作用可能是为食物消化提供酸性环境，为大多数消化酶创造适宜的反应条件，提高食物的消化效率；食道后部、食道胃和肠道前部均以Ⅲ型黏液细胞为主，富含中性黏多糖和酸性黏多糖，分泌的黏液可以帮助进一步消化和促进食物乳化成食糜，促进大分子物质在细胞膜的吸收和运输，行使主要的消化吸收功能，并与二糖和短链脂肪酸的吸收功能相关(辛俭等, 2013)；肠后部以Ⅱ型和Ⅳ型黏液细胞为主，富含酸性黏多糖，该部位分泌物的生理作用包括：(1) 润滑肠道，利于粪便的形成和排出；(2) 分泌黏液中富含溶菌酶等溶菌杀菌物质，可以防止病原生物从肛门侵入体内，降低了鱼类的发病几率。已有研究

显示,食物的消化主要是在消化酶的作用下分解为机体可以吸收的微小颗粒,消化酶的分泌与黏液细胞密切相关(赵帅等,2014)。结合本研究结果,作者认为,半滑舌鲷消化道中Ⅲ型黏液细胞应为消化酶的主要分泌细胞;Ⅱ型和Ⅳ型黏液细胞可能分泌一些免疫球蛋白,增强机体的免疫防御能力。相关研究表明,鱼类的Ⅰ型黏液细胞染色呈红色,PAS反应呈阳性(邓振旭等,2008;尹苗等,2000),仅含有中性黏多糖。本研究中,并没有发现半滑舌鲷肠道中分布有特征明显的Ⅰ型黏液细胞,可能是因为肠道生理功能的差异导致半滑舌鲷消化道中无Ⅰ型黏液细胞分布。半滑舌鲷消化道中不同类型的黏液细胞的分泌物中所含有的酶类、免疫球蛋白等类型和数量有待进一步探究,相关深入研究将为半滑舌鲷人工养殖过程中的饲料、免疫制剂等的选择与投喂策略提供科学依据。

参 考 文 献

- Arellano JM, Storch V, Sarasquete C. A histological and histochemical study of the oesophagus and oesogaster of the Senegal sole, *Solea senegalensis*. *European Journal of Histochemistry*, 2001a, 45(3): 279–294
- Arellano JM, Storch V, Sarasquete C. Histological and histochemical observations in the stomach of the Senegal sole, *Solea senegalensis*. *Histological Histopathology*, 2001b, 16(2): 511–521
- Becker AG, Gonçalves JF, Garcia IO. Morphometric parameters comparisons of the digestive tract of four teleosts with different feeding habits. *Ciência Rural*, 2010, 40(2): 862–866
- Bi B, Sun ZW, Mao TQ, *et al.* Relationship between digestive tract structure and feeding habits in common carp, grass carp, silver carp and bighead carp. *Chinese Journal of Fisheries*, 2011, 24(1): 26–30 [毕冰, 孙中武, 毛天强, 等. 鲤、鲢、鳙、草鱼消化道结构与食性的研究. *水产学杂志*, 2011, 24(1): 26–30]
- Bovic FE, Srebocan E, Kozaric Z. Starvation induced pathobiology in the gut of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Berliner Und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 2001, 114(3–4): 134–138
- Chang Q, Chen SQ, Zhang XM, *et al.* Histological study of the organogenesis of the digestive system of the tonguefish, *Cynoglossus semilaevis*. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(4): 447–453 [常青, 陈四清, 张秀梅, 等. 半滑舌鲷消化系统器官发生的组织学研究. *水产学报*, 2005, 29(4): 447–453]
- Chen MY, Zhang XM. Development of the digestive system in larval, juvenile and young turbot *Scophthalmus maximus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 30(2): 236–240 [陈慕雁, 张秀梅. 大菱鲆仔稚幼鱼消化系统发育的组织学研究. *水生生物学报*, 2006, 30(2): 236–240]
- Chen NN, Zhang LZ, Zhuang P, *et al.* On morphology and histology of the digestive tract in Siberian sturgeon *Acipenser baerii*. *Marine Fisheries*, 2011, 33(1): 20–27 [陈宁宁, 章龙珍, 庄平, 等. 西伯利亚鲟消化道形态学和组织学的初步研究. *海洋渔业*, 2011, 33(1): 20–27]
- Deng ZX, Chu DC, Li CH. Histochemistry staining of mucous cells on digestive tract of three species freshwater fish. *Biotechnology*, 2008, 18(2): 42–44 [邓振旭, 楚德昌, 李春华. 三种淡水鱼消化道黏液细胞的组织化学染色. *生物技术*, 2008, 18(2): 42–44]
- Hu LL, Li JE, Ou YJ, *et al.* Study on morphology and histology of digestive tract in cultured *Oplegnathus fasciatus*. *South China Fisheries Science*, 2010, 6(6): 65–69 [胡玲玲, 李加儿, 区又君, 等. 养殖条石鲷消化道形态构造及组织学观察. *南方水产*, 2010, 6(6): 65–69]
- Ikegabu E, Ezeasor DN, Nlebedum UC, *et al.* Morphological and histochemical observations on the oesogaster of the domesticated African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822). *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 2013, 16(2): 88–95
- Jaroszewska MK, Dabrowski KB, Wikzynska B, *et al.* Structure of the gut of the racer gobly *Neogobius gymnotrachelus* (Krebsler, 1857). *Journal of Fish Biology*, 2008, 72(2): 1773–1786
- Liu F, Zhang XJ, Liu SJ, *et al.* Histological studies on the digestive tracts in *Carassius auratus* Triploid and *Cyprinus carpio* Triploid. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 8(3): 23–32 [刘飞, 张轩杰, 刘少军, 等. 湘云鲫、湘云鲤消化道的组织学研究. *中国水产科学*, 2001, 8(3): 23–32]
- Liu XZ, Zhuang ZM, Ma AJ, *et al.* Reproductive biology and breeding technology of *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Marine Fisheries Research*, 2005, 26(5): 7–14 [柳学周, 庄志猛, 马爱军, 等. 半滑舌鲷繁殖生物学及繁育技术研究. *海洋水产研究*, 2005, 26(5): 7–14]
- Lu MM, Li HH, Lan JQ, *et al.* Morphology of the digestive tract and liver of *Plecoglossus altivelis*. *Journal of Biology*, 2012, 29(5): 25–28 [卢明明, 李海燕, 竺俊全, 等. 香鱼消化道及肝脏的形态结构特征. *生物学杂志*, 2012, 29(5): 25–28]
- Ribeiro L, Sarasquete C, Dinis MT. Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae. *Aquaculture*, 1999, 171(8): 293–308
- Sinha GM. A histochemical study of the mucous cells in the bucco-pharyngeal region of four Indian freshwater fishes in relation to their origin, development, occurrence and probable functions. *Acta Histochemica*, 1975, 53(2): 127–150
- Wan RJ, Jiang YW, Zhuang ZM. Morphological and developmental characters at the early stages of the tonguefish *Cynoglossus semilaevis*. *Acta Zoologica Sinica*, 2004, 50(1): 193–201 [万瑞景, 姜言伟, 庄志猛. 半滑舌鲷早期形态及发育特征. *动物学报*, 2004, 50(1): 193–201]
- Wang XW, Li J, Xiao ZZ, *et al.* Primary research on morphologic characteristics and inner structure of barfin flounder *Verasper moseri*. *Marine Sciences*, 2008, 32(5): 90–97 [王晓伟, 李军, 肖志忠, 等. 条斑星鲽外部形态特征与内部组织器官的初步研究. *海洋科学*, 2008, 32(5): 90–97]
- Xiao ZZ, Yu DD, Xin M, *et al.* Ontogeny of digestive system during early development stage of barfin flounder. *Marine Sciences*, 2008, 32(6): 13–17 [肖志忠, 于道德, 辛梅, 等.

- 条斑星鲽消化系统个体发生的组织学观察. 海洋科学, 2008, 32(6): 13–17]
- Xin J, Xue BG, Lou B, *et al.* The type and distribution of mucous cells in the digestive tract of *Nibea albiflora*. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2013, 32(1): 10–14 [辛俭, 薛宝贵, 楼宝, 等. 黄姑鱼消化道黏液细胞的类型和分布. 浙江海洋学院学报, 2013, 32(1): 10–14]
- Yin M, An LG, Yang GW, *et al.* Study on the type of mucous cells in carps (*Cyprinus carpio*). Chinese Journal of Zoology, 2000, 35(1): 8–10 [尹苗, 安利国, 杨桂文, 等. 鲤鱼黏液细胞类型的研究. 动物学杂志, 2000, 35(1): 8–10]
- Zhang LZ, Yang JH, Zhao F, *et al.* Microstructure and ultrastructure observation of the digestive tract of *Siganus canaliculatus*. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(2): 271–277 [章龙珍, 杨金海, 赵峰, 等. 长鳍篮子鱼消化道显微与超微结构观察. 水产学报, 2010, 34(2): 271–277]
- Zhao S, Zhu ZH, WU YY, *et al.* Histochemical localization of mucous cells and five types of enzymes in digestive tract of *Alligator sinensis*. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(5): 962–967 [赵帅, 朱红年, 吴媛媛, 等. 扬子鳄消化道黏液细胞和 5 种酶的组织化学定位. 水生生物学报, 2014, 38(5): 962–967]

(编辑 陈严)

Structure and Ultrastructure of Alimentary Canal of *Cynoglossus semilaevis*

LI Bin^{1,3}, LIU Xuezhou^{1,2①}, XU Yongjiang^{1,2}, SHI Bao^{1,2}, ZHU Xuewu^{1,3}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract This study was designed to improve the understanding of the alimentary canal of *Cynoglossus semilaevis*. The alimentary canal of *C. semilaevis* can be divided into five sections, including oropharyngeal cavity, esophagus, esophagus and intestinal junction, foregut and hindgut. The structure and ultrastructure of alimentary canal of *C. semilaevis* were investigated using anatomical, histological and electronic microscopy methods. The number of mucosal folds, the height of mucosal folds, the thickness of muscle layers (longitudinal muscle and circular muscle), the density of mucus cells were measured and analyzed. The results showed that there was no obvious morphological stomach in *C. semilaevis*, evident by the lack of typical histological structure. However, a cystic structure, namely oesogaster, was formed in posterior part of esophagus following food intake, and oesogaster shrank significantly during no food period. The principal structures of intestine canal include mucosal layer, submucosal layer, muscle layer and serosal layer. Oesogaster and intestine canal had little morphological difference based on electronic microscopic analysis. Each part of mucosal epithelial cell had mucus cells. Microvilli on the intestinal surface had no morphological difference. Microvilli of different sections, however, had differences in length, with the longest on the foregut. The size and shape of mucus cells were also different. Top cytoplasm contained significant amount of mucous granules, while surface microvilli were relatively short, inward concaving and compact together. The goblet cells were found in the front segment of esophagus. In terms of mucous cell pattern, type III mucous cell was the dominant cell type throughout the whole esophagus. Specifically, the mucous cells in oesogaster belonged to type III, whereas foregut and hindgut segments mainly contained type IV and type II mucous cells, respectively. The present study provides basic knowledge of digestive structure and mechanism of *C. semilaevis* and potentially can help to manufacture commercial diet for *C. semilaevis*.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; Alimentary canal; Oesogaster; Mucous cells; Histology

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

太平洋鳕(*Gadus macrocephalus*)亲鱼驯化 培育与早期发育特征*



徐永江^{1,2} 柳学周^{1,2①} 史宝^{1,2} 王滨^{1,2}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室
海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 采捕山东威海外海黄海海域的太平洋鳕(*Gadus macrocephalus*)亲鱼进行驯化和培育,在人工条件下成功驯化存活野生亲鱼 49 尾,经短期促熟培育后,通过人工授精方式获得了多批次受精卵。对胚胎和早期仔鱼发育过程进行了观察,详细描述了从受精卵到早期仔鱼各发育时期的形态特征。结果显示,太平洋鳕成熟卵子为沉性卵,圆球形,卵径为 0.9–1.1 mm,无油球。胚胎发育分为 5 个时期,分别为卵裂期、囊胚期、原肠胚期、神经胚期和器官形成期。在水温为 9–10℃、盐度为 27–29 的海水中孵化,受精卵历时 312 h 30 min 孵化出膜。初孵仔鱼全长为(3.85±0.12) mm,6 日龄仔鱼开口,肛门与外界相通,进入混合营养期。8 日龄仔鱼卵黄囊消耗殆尽,开始进入外源性营养阶段。仔鱼开口饵料为轮虫(*Rotifer*),12 日龄开始摄食卤虫(*Artemia salina*)无节幼体。6 日龄仔鱼鳔原基形成,16 日龄鳔充气成为亮泡状。12 日龄仔鱼形成肠道第 1 个生理弯曲,22 日龄仔鱼第 2 个肠道生理弯曲形成。研究结果可为太平洋鳕亲鱼驯化培育和苗种培育提供基础资料。

关键词 太平洋鳕; 亲鱼驯化; 胚胎发育; 早期发育

中图分类号 S962 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0159-09

太平洋鳕(*Gadus macrocephalus*)又称大头鳕,属鳕形目(Gadiformes)、鳕科(Gadidae)、鳕属(*Gadus*),属冷水性底层鱼类,其肉质白细鲜嫩,营养丰富,深受人们的喜爱。鳕鱼肝脏体积较大,且富含维生素 A 和维生素 D,是提取鱼肝油的上好原料。太平洋鳕广泛分布于太平洋北部沿岸海域,是我国北方乃至世界的重要海洋经济鱼类之一(孟庆闻等,1995)。我国太平洋鳕主要产于黄海,最高年产量曾达 2.6 万 t(唐启升等,1990),近年来,产量逐渐降低,基本形成不了捕捞产量,但市场消费需求较为旺盛,开展人工繁育和增

殖放流是养护其自然资源的主要途径。

开展早期发育特征研究是成功进行鱼类人工繁育的重要前提,可为促进养殖业发展、资源养护、环境保护等研究提供宝贵的基础资料(刘筠,1993)。国内学者对太平洋鳕人工繁育技术的研究已开展了 10 余年,但尚未突破亲鱼全人工培育和种苗大规模培育技术,主要原因在于对亲鱼驯化培育、胚胎和早期发育阶段的形态特征及其生理生态特性认识不足。目前,国内外对太平洋鳕早期发育特征的研究已取得了一些进展,如仔稚幼鱼发育形态(李艳秋,2013)¹⁾、仔

* 国家鲆鲽类产业技术体系项目(CARS-50)和国家 863 计划项目(2012AA10A413)共同资助 [This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-50), and National High Technology Research and Development Program of China (2012AA10A413)]. 徐永江, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-12-14, 收修改稿日期: 2015-12-30

1) Li YQ. Study on biology of *Gadus macrocephalus* Tilesius during early developmental stage. Master's Thesis of Dalian Ocean University [李艳秋. 太平洋鳕(*Gadus macrocephalus* Tilesius)早期发育阶段的生物学研究. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2013]

鱼饥饿不可逆点(李艳秋等, 2014)、环境适应(李艳秋等, 2013; Bian *et al*, 2015; Alderdice *et al*, 1971; Forrester *et al*, 1966)、早期消化系统发育(胡盼等, 2015)等, 但尚未见有关亲鱼培育、胚胎发育形态特征的详尽报道。作者于2012–2013年开展了太平洋鲑人工繁育技术研究, 采捕了野生亲鱼进行人工培育, 亲鱼发育成熟后, 经人工授精获得了批量优质受精卵, 仔细观察和描述了其胚胎发育和早期仔鱼的形态特征, 并对其仔鱼的卵黄营养利用进行了分析, 以期为开展该鱼的人工繁殖和育苗提供有价值的参考资料。

1 材料与方法

1.1 亲鱼来源

2012年12月–2013年3月, 在山东青岛海阔水产养殖有限公司开展了太平洋鲑亲鱼驯化培育和苗种培育实验。太平洋鲑亲鱼捕自山东威海外海海域的野生群体, 选择体色鲜亮、体表无伤、腹部膨胀的个体作为亲鱼进行培育, 以水车运回公司养殖车间暂养。

1.2 亲鱼驯化与培育

野生亲鱼放入养殖车间培育池内进行培育。培育池底面积为25 m²的方形抹角水泥池, 池深1.2 m, 池底部向中央倾斜5°, 排水口设置于池底部中央。流水充气培育, 日换水率为400%。利用玉筋鱼(*Ammodytes personatus*)进行摄食驯化。亲鱼利用耳石鉴定年龄, 并对性成熟亲鱼的精巢和卵巢形态特征进行了观察。

1.3 受精卵来源

挑选性腺成熟、活力好的亲鱼采集精子和卵子, 进行人工干法授精, 获得受精卵。受精卵清洗后, 置于2000 ml量筒内, 利用盐度分离法取上浮卵在锥形网中孵化。受精卵孵化条件: 温度为9–10℃, 盐度为27–29, 连续充气, 流水孵化。统计不同批次的受精率和孵化率, 挑选受精率高的批次受精卵用于胚胎观察。

1.4 胚胎发育特征观察

受精卵孵化早期每30–60 min取样1次, 孵化后期每2–3 h取样1次。利用NIKON(MSZ800)解剖镜观察胚胎各时期形态特征, 用NIKON coolpix 4500数码相机进行显微拍照, 描述、记录胚胎发育时序和各发育时相的特征。

1.5 仔鱼发育特征观察

仔鱼孵出后, 在室内容积为25 m³的方形抹角水泥池中进行培育。培育水温为11–13℃, 盐度为

27–29, DO≥6 mg/L, pH为7.8–8.2, NH₄⁺-N≤0.1 mg/L。仔鱼入培育池后, 先静水充气培育, 待10 d后开始流水培育, 换水率逐渐由20%增加到100%。仔鱼开口饵料为轮虫(*Rotifer*)。

自仔鱼布池开始, 每天从培育池中随机取样30–40尾, 在NIKON(MSZ800)解剖镜下观察仔鱼不同发育时期的形态特征及器官发育情况, 测量全长、卵黄囊长短径等。用NIKON coolpix 4500相机拍照, 以波恩氏固定液固定各日龄标本20–30尾, 以备实验室补充观察用。

生物学测量均采用活体测量, 用麻醉剂(FA100, 日本, 1/5000剂量)将鱼苗麻醉后, 在解剖镜下观察, 利用目微尺测量30–40尾, 数据以平均值±标准差(Mean±SD)表示。

仔鱼卵黄囊体积计算参照Alderdice等(1979)的方法:

$$V = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{r}{2} \right)^2 R$$

式中, r 为短径, R 为长径。

2 结果与分析

2.1 亲鱼驯化培育

2013年, 利用围网在黄海海域采捕太平洋鲑野生亲鱼112尾, 运回车间后置于2个培育池内培育。由于在采捕和运输过程中受伤较为严重, 亲鱼入池后在暂养驯化期间死亡率较高。人工成功驯化和培育太平洋鲑野生亲鱼49尾, 亲鱼培育成活率仅为43.7%。通过人工填喂、引导摄食等方法, 成功驯化的野生亲鱼在7–9 d后开始摄食玉筋鱼。亲鱼在培育池内游动积极, 活力较好。

对死亡野生亲鱼的耳石进行观察, 以确定亲鱼年龄。太平洋鲑耳石为卵圆形, 具有1个白色的中心核, 核外周是暗黑的夏轮带圈, 夏轮带圈之外又被1个白色轮带圈包围, 为第1冬轮带圈(年轮的标志)。其外又循环往复地每年均由夏轮带圈和冬轮带圈构成了各年的年轮。年龄为3龄的太平洋鲑耳石构造的特点是第1冬轮带圈明显较宽, 第2冬轮带圈亦稍宽, 第3冬轮带圈相对稍窄(图1)。本研究所用的亲鱼年龄都已达3龄以上。

性成熟的亲鱼性腺位于肾脏的下面, 1对, 呈左右对称分布; 雌性成鱼卵巢呈袋状, 外面包被黑色的膜, 2个卵巢后部连结在一起, 通过排卵口与外界相连, 卵巢上有2–3条粗大的血管, 经卵巢后部汇合于肾脏(图2)。雄性成鱼发育后, 精巢充满体腔, 呈脑状

结构,其上布满沟回结构,乳白色。心脏位于口咽腔下方的围心室里。通过计算得知,本研究所用野生亲鱼性成熟卵巢的绝对怀卵量为 120–150 万粒。

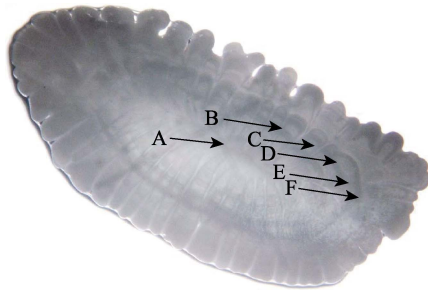


图 1 太平洋鳕耳石形态(3 龄)
Fig.1 The morphology of otolith of *G. macrocephalus*(3-year)

A: 中心核; B: 第 1 夏轮带圈; C: 第 1 冬轮带圈;
D: 第 2 夏轮带圈; E: 第 2 冬轮带圈; F: 第 3 夏轮带圈
A: Central core; B: First summer ring; C: First winter ring;
D: Second summer ring; E: Second winter ring;
F: Third summer ring



图 2 太平洋鳕的卵巢(左)和精巢(右)
Fig.2 The ovary (left) and testis (right) of *G. macrocephalus*

2.2 精卵获取

在暂养驯化期间,野生亲鱼发育正常,腹部隆起更为明显,通过挤压腹部观察生殖孔的方法,确定存活的 49 尾亲鱼中雌性个体有 27 尾,雄性个体有 22 尾。在驯化培育 35 d 后,开始人工采集配子进行人工授精。雌鱼中有 21 尾可采集到卵子,雄鱼全部可采集到精液。利用 21 尾雌鱼共采集卵子 20 批次,人工授精获得受精卵 15 批次,各批次受精率在 75%–95%之间,孵化率为 10%–35%。

2.3 胚胎发育特征

太平洋鳕成熟卵子为圆球形,沉性,具轻度黏性。卵膜透明光滑,卵黄均匀,无油球,卵直径为 0.9–1.1 mm。在水温为 9–10℃、盐度为 27–29 的海水中,受精卵历时 312 h 30 min(50%以上仔鱼孵出)完成整个胚胎发育过程。胚胎发育特征见表 1。

2.3.1 卵裂前期 卵子受精后 1 h,受精膜举起,原生质在动物极汇集,形成一个圆盘状隆起,胚盘形成,卵周隙扩大(图 3-1)。

2.3.2 卵裂期(盘状卵裂) 受精后 5 h 20 min,胚盘进行首次水平分裂,卵裂方式为径裂,将胚盘分成大小相等的 2 个卵裂球,即 2 细胞期(图 3-2);受精后 7 h 20 min,胚盘进行第 2 次分裂,此次分裂与第 1 次卵裂在同一水平面内,方向与第 1 次分裂相垂直,胚盘被分成 4 个等大的细胞,进入 4 细胞期(图 3-3);受精后 9 h 20 min,进行第 3 次卵裂,与第 1 次卵裂面平行,胚盘被分成近似相等的 8 个细胞,呈 2 排排列,进入 8 细胞期(图 3-4);受精后 11 h 20 min,进行第 4 次卵裂,在与第 2 次分裂面平行的平面上形成分裂面,形成近乎等大的 16 细胞(图 3-5);第 5 次卵裂发生在受精后 14 h,分裂后细胞排列不规则,发育进行到 32 细胞期(图 3-6);受精后 17 h 20 min,胚盘进行第 6 次卵裂,进入 64 细胞期,此时细胞呈多层不规则排列,细胞大小和形状也不同(图 3-7);受精后 20 h 30 min,经多次分裂,细胞明显变小,层次逐渐增多,在卵黄上方形成桑椹状,即桑椹胚期(图 3-8)。

2.3.3 囊胚期 受精后 21 h 30 min,细胞继续分裂,细胞体积越来越小,数量增多,在卵黄上方形成空腔的高帽状隆起,为高囊胚期(图 3-9);此后,囊胚细胞继续不断分裂,囊胚边缘细胞不断增多并开始下包,受精后 44 h 30 min,高囊胚高度下降且边缘变薄,进入低囊胚期(图 3-10)。

2.3.4 原肠期 受精后 59 h 30 min,囊胚高度继续下包卵黄至 1/3 处,腔体扩大,囊胚边缘开始内卷形成一圈环状隆起即胚环(图 3-12),进入原肠早期,增厚的胚盾形成(图 3-11);受精后 74 h 30 min,原肠胚下包卵黄囊至 1/2 处,胚体雏形形成,进入原肠中期(图 3-13);受精后 83 h 30 min,原肠胚下包至卵黄 2/3 处,胚体前端出现略膨大的脑泡,头部和尾部分化明显,进入原肠晚期(图 3-14)。

2.3.5 神经胚期 受精后 99 h 30 min,原肠胚下包卵黄囊 4/5,原口即将关闭。胚盾背部中线明显加厚,形成神经板,神经板两侧向中部折叠,形成神经褶,神经褶前部膨大形成脑原基,之后,神经褶从神经沟中部愈合并逐渐向两端愈合,形成神经管,眼泡形成,早期视囊原基出现(图 3-15)。

2.3.6 胚体发育期 受精后 108 h 30 min,原口完全关闭,胚体包卵黄囊 1/2。随着头部器官的不断分化,出现 3 个初级脑室(端脑、中脑、后脑),眼囊出现在脑泡两侧,呈长椭圆形;胚体后部肌节分化,可见 4–6 对肌节对称分布于胚体两侧,克氏泡出现(图 3-16);

表1 太平洋鳕胚胎发育特征
Tab.1 Embryonic development characteristics of *G. macrocephalus*

受精后时间 Duration post fertilization	胚胎发育时期 Embryonic development stage	主要发育特征 Developmental characteristics	备注 Remarks
0	受精卵 Fertilized egg		
1 h	胚盘形成 Blastodisc formation	原生质在动物极集聚, 形成一个圆盘状隆起, 即胚盘	图 3-1
5 h 20 min	2 细胞期 2-cell stage	第 1 次卵裂, 形成 2 个等大细胞	图 3-2
7 h 20 min	4 细胞期 4-cell stage	第 2 次卵裂, 形成 4 个等大细胞	图 3-3
9 h 20 min	8 细胞期 8-cell stage	第 3 次卵裂, 形成 8 个等大细胞	图 3-4
11 h 20 min	16 细胞期 16-cell stage	第 4 次卵裂, 形成 16 个等大细胞	图 3-5
14 h	32 细胞期 32-cell stage	第 5 次卵裂, 形成不规则的 32 个细胞	图 3-6
17 h 20 min	64 细胞期 64-cell stage	第 6 次分裂, 形成大小不等的 64 个细胞	图 3-7
20 h 30 min	桑椹胚期 Morula stage	多次分裂后多层细胞堆积在卵黄上方, 形似桑椹	图 3-8
5 h 35 min	高囊胚期 High blastula stage	细胞在卵黄上方呈半圆形隆起, 囊胚呈高帽状	图 3-9
44 h 30 min	低囊胚期 Low blastula stage	胚盘开始下包, 囊胚高度下降变为扁平, 紧贴于卵黄囊上	图 3-10
59 h 30 min	原肠早期 Early gastrula stage	出现胚环和胚盾, 原肠胚下包卵黄 1/3	图 3-11, 图 3-12
74 h 30 min	原肠中期 Middle gastrula stage	原肠胚下包卵黄 1/2	图 3-13
83 h 30 min	原肠晚期 Late gastrula stage	原肠胚下包卵黄 3/4, 胚盾变细长	图 3-14
99 h 3 0min	神经胚期 Nurala stage	原口即将关闭, 神经胚初步形成	图 3-15
108 h 30 min	胚体下包 1/2 Embryo encircle 1/2 of yolk sac	原口关闭, 胚体下包卵黄 1/2, 隐约可见 4-6 对肌节对称分布	图 3-16
112 h 3 0min	胚体下包 2/3 Embryo encircle 2/3 of yolk sac	眼囊出现在脑泡两侧, 呈长椭圆形, 肌节 7-9 对	图 3-17
117 h 30 min	胚体下包 3/4 Embryo encircle 3/4 of yolk sac	眼囊逐渐变圆, 胚体开始出现色素	图 3-18
153 h 30 min	晶体出现期 Crystalline lens stage	眼囊变圆, 晶体出现, 胚体上体节和色素细胞数量增多	图 3-19
195 h 30 min	尾芽期 Tail-bud stage	胚体末端外向一侧, 形成尾芽, 胚体包卵黄一周	图 3-20
225 h 30 min	肌肉效应期 Muscular contraction stage	胚体开始出现间断性微弱的肌肉收缩	图 3-21
250 h 30 min	心跳期 Heartbeat stage	心脏开始出现轻微搏动	图 3-22
306 h 30 min	出膜期 Membrane rupture stage	胚体在卵膜内不停转动, 肌肉抽动更加频繁有力, 开始破膜	图 3-23
312 h 30 min	初孵仔鱼 Newly-hatched larvae		图 3-24

受精后 112 h 30 min, 视囊轮廓清晰, 肌节数量为 7-8 对, 胚体包卵黄囊至 2/3 处(图 3-17); 受精后 117 h 30 min, 一对听囊出现在视囊后方, 体节数增至 12-16 对, 背部枝状色素细胞增多, 胚体包卵黄囊至 3/4 处(图 3-18); 受精后 153 h 30 min, 眼囊变为圆形, 晶体出现, 体节数为 30-35 对, 胚体遍布点状黑色素细胞, 心脏原基明显, 克氏泡消失(图 3-19); 受精后 195 h 30 min, 胚体末端出现锥状尾芽, 尾芽与卵黄囊分离, 胚体增厚, 胸鳍原基出现, 色素细胞呈星状, 主要分布于中脑至尾部, 卵黄周隙增大, 胚体包卵黄囊一周(图 3-20)。

2.3.7 肌肉效应期 受精后 225 h 30 min, 胚体绕卵黄囊 7 d 多, 尾部扭转明显, 卵黄囊体积缩小和胚体头部间出现空隙, 头部出现很多浅黑色的点状色素, 胚体均匀分布点状黑色素。胚体出现间断性微弱的肌肉收缩(肌肉效应), 收缩时从背部肌节开始向尾部传递, 继而尾

部开始摆动, 约 2 min 出现 1 次肌肉效应(图 3-21)。

2.3.8 心跳期 受精 250 h 30 min 后, 头部眼囊下方出现近圆形的心脏, 开始出现轻微搏动, 随着胚胎发育时间的延长, 搏动频率加快, 跳动有力, 心跳次数由开始的 24 次/min 增加到 67 次/min。胚体头部及背部的点状色素增多, 原星状黑色素收缩成少数几个较大、颜色较深的点状黑色素(图 3-22)。

2.3.9 出膜期 随着胚胎发育的进行, 胚体抖动幅度和频率加大, 胚体在卵膜内不停地转动, 卵黄囊进一步缩小, 晶体变黑, 头部点状色素消失, 整个胚体点状色素集中在背部躯干和近尾部 2 个区域, 背部近头部及腹部有零星色素点(图 3-23)。受精后 312 h 30 min, 胚体破膜而出, 孵出时大多数胚体头部首先破膜, 之后尾部用力摆动脱去卵膜, 少数个体尾部率先破膜; 刚孵出仔鱼悬浮在水中, 游泳能力较弱(图 3-24)。

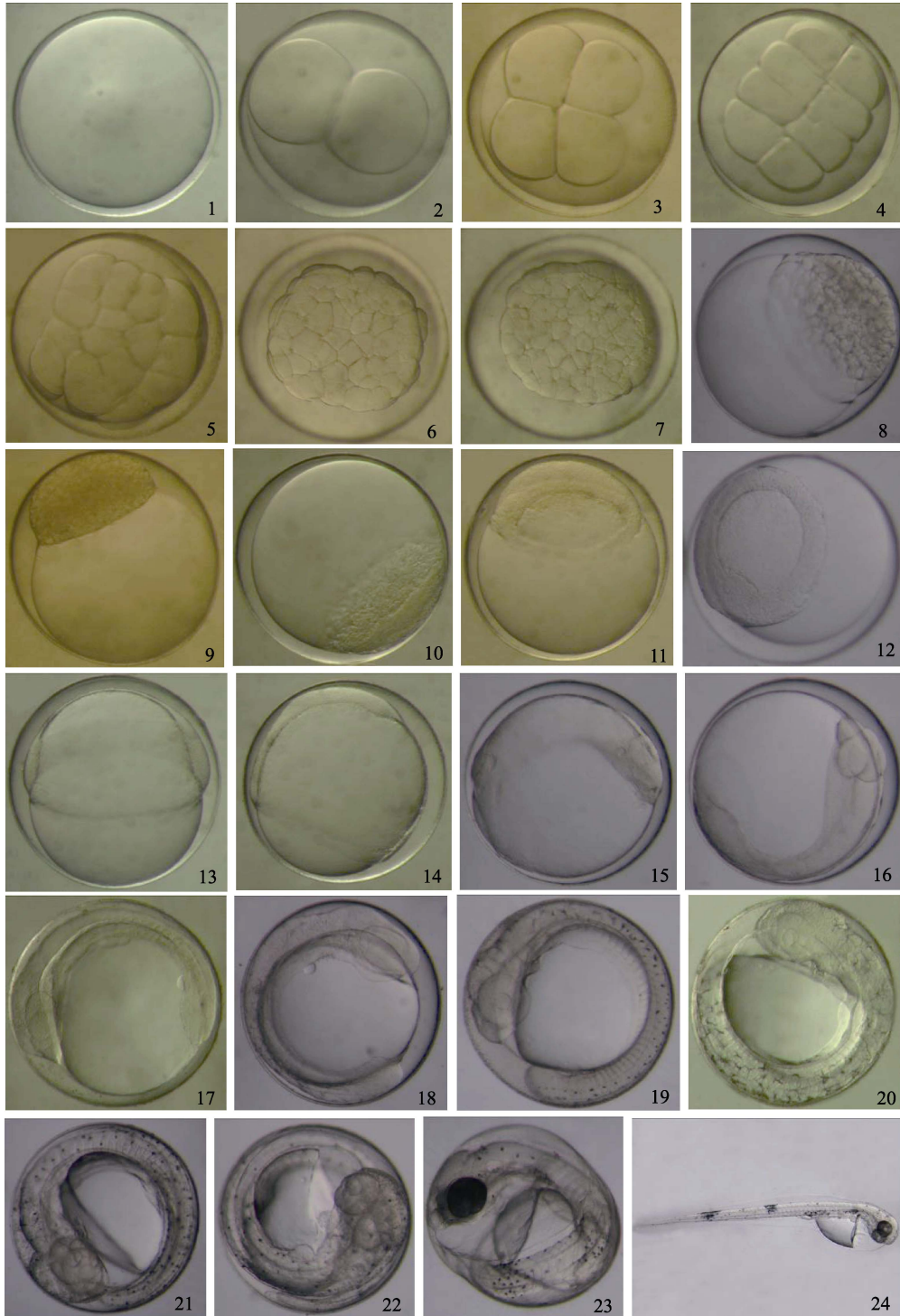


图 3 太平洋鳕胚胎的发育形态

Fig.3 Developmental morphology of *G. macrocephalus* embryos

1: 受精卵; 2: 2 细胞期; 3: 4 细胞期; 4: 8 细胞期; 5: 16 细胞期; 6: 32 细胞期; 7: 64 细胞期; 8: 桑椹期; 9: 高囊胚; 10: 低囊胚; 11: 原肠早期; 12: 胚盾期; 13: 原肠中期; 14: 原肠晚期; 15: 神经胚; 16: 胚体包 1/2; 17: 胚体包 2/3; 18: 胚体包 3/4; 19: 晶体期; 20: 尾芽期; 21: 肌肉效应期; 22: 心跳期; 23: 出膜期; 24: 初孵仔鱼

1: Fertilized egg; 2: 2-cell stage; 3: 4-cell stage; 4: 8-cell stage; 5: 16-cell stage; 6: 32-cell stage; 7: 64-cell stage; 8: Morula stage; 9: High blastula stage; 10: Low blastula stage; 11: Early gastrula stage; 12: Embryonic shield stage; 13: Mid-gastrula stage; 14: Late gastrula stage; 15: Neural stage; 16: Embryo encircle 1/2 of yolk sac; 17: Embryo encircle 2/3 of yolk sac; 18: Embryo encircle 3/4 of yolk sac; 19: Crystalline lens stage; 20: Tail-bud stage; 21: Muscular contraction stage; 22: Heart beat stage; 23: Membrane rupture stage; 24: Newly-hatched larva

2.4 早期仔鱼发育特征

2.4.1 数量形态特征 初孵仔鱼(图 4-1), 全长为(3.85±0.12) mm($n=30$), 卵黄囊为半透明、半椭圆形, 部分仔鱼卵囊前部与头之间有一个明显的空腔。眼径为(0.20~0.25) mm, 肛前距为(1.41±0.02) mm($n=30$)。头部向下紧贴在卵黄囊上, 分化为 5 部分, 分布少量黑色素,

耳石清晰。消化管平直, 紧贴卵黄囊背部边缘分布。仔鱼脊索位于体上侧, 略弯曲细长。背鳍膜、腹鳍膜和尾鳍膜连成一体, 背鳍膜始于脑后方, 腹鳍膜始于卵黄囊末端, 鳍膜透明。躯干部分布鸟粪状黑色素, 间杂零星分布点状黑色素。肛门未与外界联通。初孵仔鱼头向下均匀倒悬分布在水体中, 各水层都有分布,

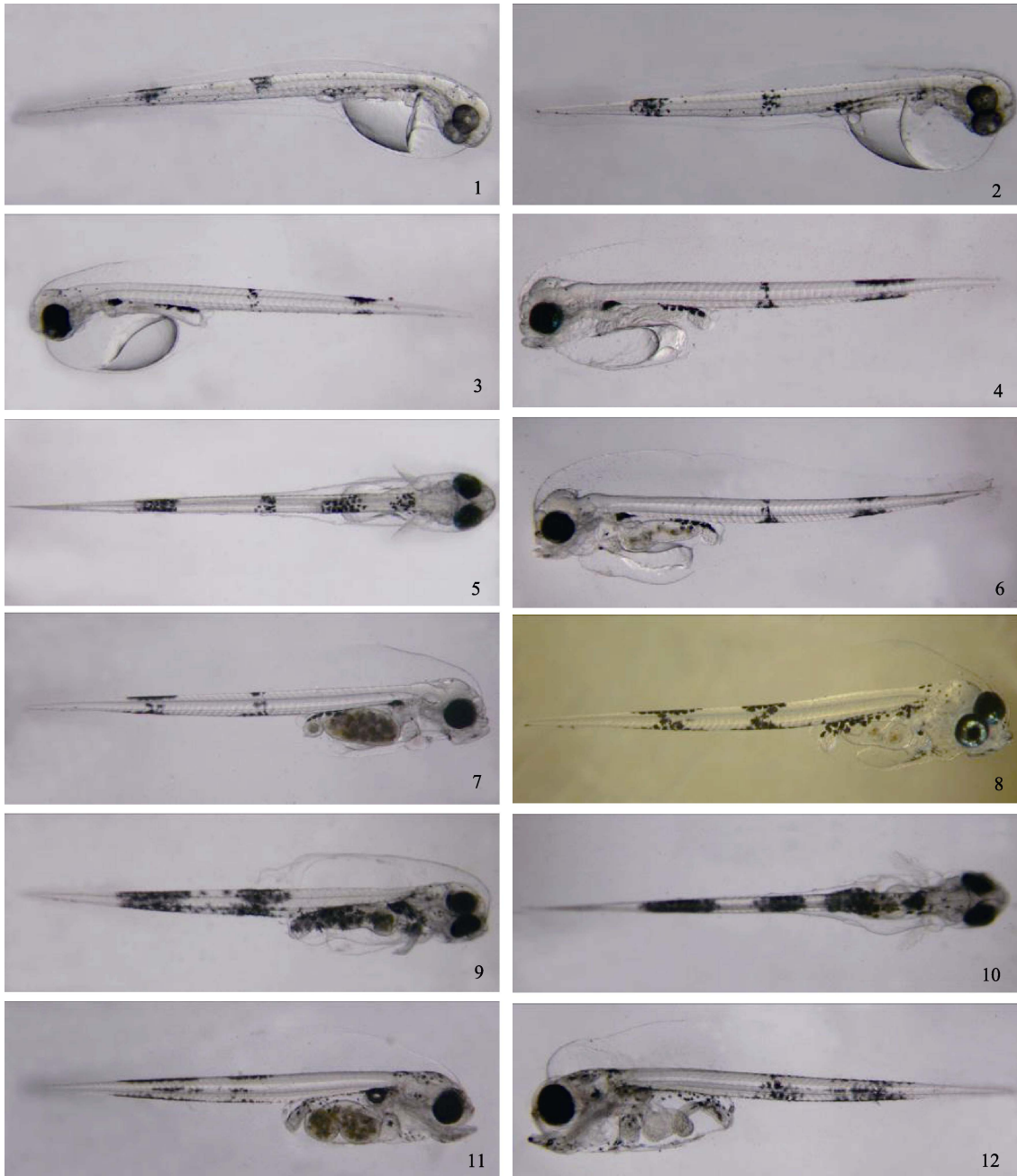


图 4 太平洋鲑前期仔鱼发育形态

Fig.4 Developmental morphology of early larva of *G. macrocephalus*

- 1: 初孵仔鱼; 2: 1 d 仔鱼; 3: 3 d 仔鱼; 4: 4 d 仔鱼; 5: 4 d 仔鱼背部观; 6: 6 d 仔鱼; 7: 8 d 仔鱼;
8: 12 d 仔鱼; 9: 16 d 仔鱼; 10: 16 d 仔鱼背面观; 11: 22 d 仔鱼; 12: 27 d 仔鱼
1: Newly-hatched larva; 2: 1 d larva; 3: 3 d larva; 4: 4 d larva; 5: 4 d larva (back side view); 6: 6 d larva;
7: 8 d larva; 8: 12 d larva; 9: 16 d larva; 10: 16 d larva (back side view); 11: 22 d larva; 12: 27 d larva

无集群现象, 活动能力较弱。

1 d 仔鱼(图 4-2), 全长为(4.15±0.12) mm, 眼径为(0.20–0.25) mm, 肛前距为(1.41±0.02) mm($n=30$)。卵黄囊缩小, 体积消耗约 20%。头部未完全脱离卵黄囊, 眼囊颜色加深, 膀胱可见亮泡状原基。躯干中部和近尾端的色素密度增加。仔鱼主要分布于水体中上层, 活动力略有增强。

3 d 仔鱼(图 4-3), 全长为(4.55±0.18) mm, 眼径为(0.25–0.30) mm, 肛前距为(1.52±0.03) mm($n=30$)。卵黄囊持续吸收, 体积消耗约 45%。仔鱼头部仍未完全抬起, 眼囊颜色为淡绿色, 晶体变黑, 体色透明。消化管直而细长, 肠道开始膨大变粗, 肠道后端与膀胱连接处出现缢痕。肛门未开通。胸鳍原基形成, 呈叶状, 可以扇动, 肠道与躯干连接部出现黑色素细胞并不断增多。仔鱼游泳能力增强, 多分布在水体中上层, 靠身体摆动游动。仔鱼营养完全依靠内源性营养。

4 d 仔鱼(图 4-4, 图 4-5), 全长为(4.62±0.08) mm, 眼径为(0.25–0.30) mm, 肛前距为(1.58±0.09) mm ($n=30$)。卵黄囊消耗约 60%。头脱离卵黄囊完全抬起。眼睛完全变黑色, 带淡绿色。口部形成, 口端突出, 未开口。肠道开始充气, 可见膨胀, 其上黑色素分布密度增大。肛门未与外界相通(图 4-5)。头顶分布 2–3 个点状黑色素。近尾端黑色素带延长, 密度增加。

6 d 仔鱼(图 4-6), 全长为(4.71±0.02) mm, 眼径为 0.30 mm, 肛前距为(1.62±0.04) mm($n=30$)。卵黄囊仅有少量残余。口裂长约 0.25 mm。仔鱼开口, 肛门与外界联通。鳔原基形成。消化管加粗、变短, 内可见吞入的藻类残渣。仔鱼平游, 游泳能力增强。背部俯视图可见 4 条明显的色素带, 分别位于头部脑后方、消化道上方躯干部、肛门上方躯干部和近尾端躯干部。

8 d 仔鱼(图 4-7), 全长为(4.94±0.13) mm。眼径为 0.30 mm, 肛前距为(1.82±0.09) mm($n=30$)。卵黄完全消耗殆尽。口裂长约 0.25 mm, 鳔未充气。肠道内可见轮虫等食物。背鳍膜高度增加, 仔鱼在水中平游, 一般靠尾部的摆动而蹿动, 多数时间静止。

12 d 仔鱼(图 4-8), 全长为(5.14±0.15) mm。眼径为(0.30–0.35) mm, 肛前距为(2.08±0.12) mm($n=30$)。鱼体透明, 眼囊亮绿色。鳔充气。肠道形成第 1 个生理弯曲, 开始摄食卤虫(*Artemia salina*)无节幼体。躯干上 4 个色素带色素增多, 鳔原基与肛门处的 2 个色素带逐渐连接成长的色素带, 其中, 枝状色素体积大且数量多。仔鱼巡游模式建立, 多在水体上层游动, 仔鱼摄食率达 90%以上。

16 d 仔鱼(图 4-9, 图 4-10), 全长为(5.47±0.13) mm, 肛前距为(2.24±0.07) mm($n=30$)。躯干部 2 个色素带连通, 消化道上方的黑色素继续增多。胸鳍发达, 鳍条形成。鳔充气, 体积增大。仔鱼活力强, 游动速度加快。

22 d 仔鱼(图 4-11), 全长为(5.69±0.09) mm, 肛前距为(2.33±0.07) mm($n=30$)。鳔充气成为亮泡状, 肠道第 2 个生理弯曲形成, 肠道内食物较多。背鳍膜前端与后端出现分隔。

27 d 仔鱼(图 4-12), 全长为(6.08±0.13) mm, 肛前距为(2.49±0.04) mm($n=30$)。

2.4.2 卵黄的吸收过程 太平洋鳕初孵仔鱼口裂未开, 无摄食能力, 仅依靠卵黄囊内源性营养进行生长代谢。初孵仔鱼全长为(3.85±0.12) mm, 卵黄囊体积为 $146.12 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$; 随着仔鱼生长发育, 卵黄囊迅速被吸收, 1 d 仔鱼的卵黄囊消耗约 54%, 2 d 仔鱼卵黄囊消耗 73.1%, 至孵化后第 4 天, 约 97%的卵黄被吸收利用, 至孵化后第 6 天, 卵黄基本消耗殆尽, 仅有少量残余, 至第 8 天卵黄完全吸收完毕(表 2)。6 d 仔鱼开口, 进入摄食期, 仔鱼开始摄食轮虫, 进入外源性营养阶段, 仔鱼摄食和游泳能力增强。

3 讨论

本研究所用亲鱼为每年 12 月–翌年 2 月期间采捕于山东威海外海海域的野生亲鱼, 挑选性腺发育成熟且腹部隆起明显的个体作为繁殖用亲鱼, 运回培育车间进行短期培育, 通过人工授精方式获得受精卵。

表 2 太平洋鳕仔鱼卵黄的吸收进程

Tab.2 The process of yolk absorption of *G.macrocephalus* larvae

孵出后时间 Days after hatching (d)	全长 Total length (mm)	卵黄囊长径 Long diameter of yolk sac (mm)	卵黄囊短径 Short diameter of yolk sac (mm)	卵黄囊体积 Yolk sac volume (10^{-3} mm^3)
0	3.85±0.12	0.83±0.09	0.58±0.07	146.12
1	4.15±0.12	0.56±0.04	0.48±0.06	67.52
2	4.37±0.18	0.52±0.04	0.38±0.03	39.29
3	4.55±0.18	0.51±0.06	0.34±0.05	30.85
4	4.62±0.08	0.15±0.02	0.20±0.01	3.14
6	4.71±0.02	0.05±0.01	0.11±0.01	0.32
8	4.94±0.13	0	0	0

2012–2013年,研究了太平洋鳕野生亲体的驯化和培育关键技术,人工条件下成功培育存活野生亲鱼49尾,获得了受精卵15批次。但是,获得的各批次受精卵质量参差不齐,受精率和孵化率差异较大,其主要原因可能在于所用亲鱼均为野生亲鱼,短暂培育后用于繁殖,无法像半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) (柳学周等, 2006)、大菱鲂(*Scophthalmus maximus*) (雷霖, 2003)等鱼类一样可以人工培育亲鱼,且可精准控制亲鱼的营养状况、性腺发育进程等条件,因此,获得的受精卵质量批次间差异较大。今后,应深入开展太平洋鳕野生亲鱼的驯化、培育工作,如确立适宜的采捕季节、采捕方式、运输方式、培育条件等,提高野生亲鱼培育的成活率。同时,应开展全人工亲鱼培育研究,获得高质量的人工亲鱼用于苗种繁育生产。

鱼类胚胎及胚后发育的形态特征是繁育生物学的重要研究内容,对于育苗生产中准确把握受精卵孵化及鱼苗培育的关键技术环节、提高孵化率与育苗成活率意义重大。太平洋鳕受精卵为圆球形,卵裂方式为典型的端黄卵的盘状卵裂,以下包的形式形成原肠胚,胚胎发育的各个发育时期的形态特征和发育时间与已报道的海水鱼类基本一致(柳学周等, 2008、2009)。Hall等(2004)对大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)胚胎发育的研究表明,其器官分化发生在原肠包卵1/3时,体节分化则发生在原肠包卵黄囊1/2时,太平洋鳕的器官分化时间晚于大西洋鳕鱼,这可能是由于种的差异引起的。

太平洋鳕卵子具有黏性,孵化过程中受精卵容易下沉到孵化容器底部黏连成块状,造成受精卵缺氧而异常死亡。另外,太平洋鳕属低温种类,其受精卵孵化水温较多数海水鱼类低,与鲽形目的条斑星鲽(*Verasper moseri*)类似,但是,受精卵孵化时间较条斑星鲽长(柳学周等, 2009; 万瑞景等, 2004; 马学坤等, 2008; 宁鑫等, 2011),且其从胚盘形成到细胞分裂期时间较长(约4.5 h),因此,需要在受精卵孵化过程中加强孵化操作管理,尽量保持孵化水温恒定和充气均匀,同时应及时清除死亡受精卵,保障孵化水质优良。本研究使用了底部锥形的孵化网,采用底部向上充气的方式,尽量使受精卵均匀分散在水体中,取得了相对较好的孵化效果。研究过程中还发现,不同批次间的卵子,即使初始受精率较高,但孵化过程中胚胎死亡率也高,最终孵化率差异较大。因此,受精卵孵化过程中除应加强孵化条件优化和管理外,还应对其胚胎发育的生理生化特性及其对环境的适应机制进行深入研究,以期建立成熟的长周期黏性卵孵化

技术提供支撑。

温度对早期仔鱼的发育影响明显,李艳秋(2013)¹⁾发现,在水温为7.8–10℃条件下,太平洋鳕在8日龄开口摄食。本研究表明,在水温为11–13℃条件下,仔鱼6日龄开口,卵黄基本消耗完毕,由内源性营养期进入混合营养期。混合营养期的长短对苗种的营养转换和苗种培育成活具有重要意义,因此,在苗种早期培育过程中应保持适宜的温度,使得卵黄的吸收速度与仔鱼向外源性营养速度相适应,以提高鱼苗成活率。本研究发现,太平洋鳕前期仔鱼生长缓慢,且在轮虫向肉虫无节幼体的饵料转换不畅,造成此时期仔鱼的大量死亡,因此,今后应加强仔鱼消化生理及其调控机制的研究,为建立高效的饵料转换调控技术提供依据。另外,在人工繁育过程中发现,部分批次的受精卵孵化出的初孵仔鱼卵黄囊与头部之间有较大空隙存在,进一步观察发现,这可能是一种发育异常现象,与空隙较小或没有空隙的个体相比,头部有较大空隙仔鱼死亡率较高,这种头部与卵黄囊间的空隙现象可能与亲鱼的营养状态和受精卵质量有关,具体的原因和机制有待于进一步研究。

参 考 文 献

- Alderice DF, Forrester CR. Effects of salinity, temperature, and dissolved oxygen on early development of the Pacific cod (*Gadus macrocephalus*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1971, 28(6): 883–902
- Bian XD, Zhang XM, Yasunari S, *et al.* Interactive effects of incubation temperature and salinity on the early life stages of Pacific cod *Gadus macrocephalus*. *Deep-Sea Research. II: Topical Studies in Oceanography*, 2015, 124: 117–128
- Forrester CR, Alderice DF. Effects of salinity and temperature on embryonic development of the Pacific cod (*Gadus macrocephalus*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1966, 23(3): 319–341
- Hall EH, Smith P, Johnston IA. Stages of embryonic development in the Atlantic cod *Gadus morhua*. *Journal of Morphology*, 2004, 259(3): 255–270
- Hu P, Gong X, Han YZ, *et al.* Ontogenetic morphological and histological development of digestive system in larval Pacific cod *Gadus microcephalus*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2015, 30(3): 243–247 [胡盼, 宫雪, 韩雨哲, 等. 太平洋鳕仔鱼消化系统发育形态学和组织学观察. *大连海洋大学学报*, 2015, 30(3): 243–247]
- Lei JL, Ma AJ, Liu XF, *et al.* Study on the development of embryo, larval and juvenile of turbot *Scophthalmus maximus* L. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2003, 34(1): 9–18 [雷霖, 马爱军, 刘新富, 等. 大菱鲂(*Scophthalmus maximus* L.) 胚胎及仔稚幼鱼发育研究. *海洋与湖沼*, 2003, 34(1): 9–18]
- Li YQ, Jiang ZQ, Sun Y, *et al.* Experimental starvation on

1) Li YQ. Study on biology of *Gadus macrocephalus* Tilesius during early developmental stage. Master's Thesis of Dalian Ocean University [李艳秋. 太平洋鳕(*Gadus macrocephalus* Tilesius)早期发育阶段的生物学研究. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2013]

- Gadus macrocephalus* and definition of the point of no return. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(14): 3873–3878 [李艳秋, 姜志强, 孙阳, 等. 太平洋鳕仔鱼饥饿实验及不可逆生长点的确定. *生态学报*, 2014, 34(14): 3873–3878]
- Li YQ, Wu H, Sun Y, *et al.* The influences of light intensity on feeding of *Gadus macrocephalus* larvae. *XianDai NongYe KeJi*, 2013, 4: 273–276 [李艳秋, 吴洪, 孙阳, 等. 不同光照强度对太平洋鳕仔鱼摄食的影响. *现代农业科技*, 2013(4): 273–276]
- Liu XZ, Xu YJ, Liu XF, *et al.* Embryonic and post-embryonic development of barfin flounder *Verasper moseri*. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2009, 40(6): 699–706 [柳学周, 徐永江, 刘新富, 等. 条斑星鲽(*Verasper moseri*)的早期生长发育特征. *海洋与湖沼*, 2009, 40(6): 699–706]
- Liu XZ, Xu YJ, Wang YY, *et al.* Characters of development and growth of early life stages of the rock bream *Oplegnathus fasciatus*. *Acta Zoologica Sinica*, 2008, 54(2): 332–341 [柳学周, 徐永江, 王妍妍, 等. 条石鲷的早期生长发育特征. *动物学报*, 2008, 54(2): 332–341]
- Liu Y. Reproductive biology of farmed fishes in China. Beijing: China Agriculture Press, 1993, 81–89 [刘筠. 中国养殖鱼类繁殖生物学. 北京: 中国农业出版社, 1993: 81–89]
- Ma XK, Liu XZ, Wen HS, *et al.* Embryonic and larval development in southern flounder *Paralichthys lethostigma*. *South China Fisheries Science*, 2008, 4(1): 41–47 [马学坤, 柳学周, 温海深, 等. 漠斑牙鲆胚胎及仔稚鱼发育的形态学观察. *南方水产*, 2008, 4(1): 41–47]
- Meng QW, Su JX, Miu XZ. *Fish Taxonomy*. Beijing: China Agriculture Press, 1995 [孟庆闻, 苏锦祥, 缪学祖. 鱼类分类学. 北京: 中国农业出版社, 1995]
- Ning X, Liu XZ, Sun ZZ, *et al.* Morphological development and growth pattern of *Verasper variegatus*, Temminck et Schlegel in early life stages. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(2): 7–15 [宁鑫, 柳学周, 孙中之, 等. 圆斑星鲽的早期生长发育特征. *渔业科学进展*, 2011, 32(2): 7–15]
- Tang QS, Ye MZ. Exploitation and conservation of offshore fishery resources in Shandong Province. Beijing: China Agriculture Press, 1990, 43–211 [唐启升, 叶懋中. 山东近海渔业资源开发与保护. 北京: 中国农业出版社, 1990, 43–211]
- Wan RJ, Jiang YW, Zhuang ZM. Morphological and developmental characters at the early stages of the tonguefish *Cynoglossus semilaevis*. *Acta Zoologica Sinica*, 2004, 50(1): 193–201 [万瑞景, 姜言伟, 庄志猛. 半滑舌鳎早期形态及发育特征. *动物学报*, 2004, 50(1): 193–201]
- Wang W, Jiang ZQ, Meng FP, *et al.* The effects of sharply changes in temperature on survival and indices of physiology and biochemistry in Pacific cod *Gadus microcephalus*. *Fisheries Science*, 2012, 31(8): 463–466 [王伟, 姜志强, 孟凡平, 等. 急性温度胁迫对太平洋鳕仔稚鱼成活率、生理生化指标的影响. *水产科学*, 2012, 31(8): 463–466]

(编辑 陈严)

Domestication of Wild Broodstock and Early Development of Pacific Cod (*Gadus macrocephalus*)

XU Yongjiang^{1,2}, LIU Xuezhou^{1,2}①, SHI Bao^{1,2}, WANG Bin^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

Abstract Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) is a commercial potential species for marine fish aquaculture. The present study used a wild population of *Gadus macrocephalus* that was captured from the open sea of Weihai (Yellow Sea region). Under captivity, 49 wild individuals survived and acclimated to broodstock rearing conditions. Shortly, 15 batches of fertilized eggs were collected. Embryogenesis and early larval development of *G. macrocephalus*, including morphological features and development time, were described. *G. macrocephalus* spawned demersal and slightly adhesive eggs. Eggs were almost spherical and had no oil globules with diameter about 0.9–1.1 mm. The embryonic development of *G. macrocephalus* was divided into five stages, namely cleavage stage, blastula stage, gastrula stage, neurula stage as well as organogenesis stage. Embryos hatched out after 312 h 30 min in the sea water when the temperature was 9–10°C. The total length of newly hatched larva was (3.85±0.12) mm. Larva opened mouth at 6 days post hatching (dph) and started exogenous nutrition (first-feeding) stage. The yolk was completely absorbed at 8 dph. Primordial swimming bladder appeared at 6 dph and was filled with air at 16 dph. The first and second intestine physiological curvature formed at 12 dph and at 22 dph, respectively. This study provides the important baseline reference for broodstock management and larviculture of *G. macrocephalus*.

Key words *Gadus macrocephalus*; Broodstock domestication; Embryogenesis; Larval development

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

编码金属标签对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) 苗种标记的效果*



徐永江^{1,2} 柳学周^{1,2①} 张凯³ 蓝功岗³ 史宝^{1,2}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室
海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 青岛贝宝海洋科技有限公司 青岛 266400)

摘要 为了开发适宜牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)苗种放流的标志技术,利用编码金属标签(CWT)对不同规格牙鲆苗种进行了标记实验,并从标记死亡率、脱标率、适宜标记鱼规格等方面评价了CWT的标记效果。结果显示,CWT标记3种规格的牙鲆苗种后,脱标均发生在标记后的4d内,其后未再发生脱标现象。小规格苗种[全长为(5.92±0.41)cm]死亡率较高(13%),中规格苗种[全长(8.92±0.36)cm]死亡率为2%,大规格苗种[全长为(12.06±0.62)cm]死亡率为1%。小规格、中规格和大规格苗种脱标率分别为3.3%、2.4%和0.7%。建立了标记死亡率(M)与苗种全长(TL)、体厚度(BT)的关系模型: $M=0.7254 TL^2-15.3220 TL+79.4260 (R^2=0.9601)$; $M=1.3627 BT^2-15.5610 BT+44.4330 (R^2=0.9645)$,为适宜苗种规格选择与标记效果评价提供了依据。今后利用CWT标签进行牙鲆苗种标志放流时,建议选择全长6cm以上的苗种进行背部肌肉标记,标记对苗种游泳行为和生长无影响,表明CWT是一种适宜在牙鲆大规模标志放流中应用的理想标志方式。

关键词 编码金属标签; 牙鲆苗种; 标记效果; 评价模型

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0168-07

人类活动与气候变化双重因素造成了海洋渔业资源的不断衰退,开展重要经济渔业种群的修复与重建日益受到各国政府和学者的重视。世界范围内,增殖放流已经成为修复与重建衰退渔业种群最直接和最有效的途径,同时也是一种渔业资源管理的有效工具(Bell *et al.*, 2008)。2006年以来,我国开展了大规模水生生物增殖放流活动,近年来的研究证明,增殖放流已对我国近岸渔业资源修复起到了积极的促进作用(程家骅等, 2010; 成为为等, 2014; 姜亚洲等, 2016)。

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是我国重要的渔业经

济物种,近年来,由于过度捕捞和近岸环境变化加剧,其资源量一直处于下降状态(单秀娟等, 2012)。我国自20世纪80年代开展牙鲆增殖放流研究(吴鹤洲等, 1987),2006年以来,山东等沿海地区年放流牙鲆苗种数量达数千万尾。然而,我国在牙鲆放流苗种的存活、生长及迁移路线、放流与野生种群互相作用等方面的研究较少,不利于对资源修复效果的评价。“标志放流-回捕”技术是水生生物增殖放流效果评价的主要手段。在利用人工培育苗种进行增殖放流时,选择适宜的标志方式对于评价放流种类的增殖效果显得尤为重要

* 国家鲆鲽类产业技术体系项目(CARS-50)、中国水产科学研究院黄海水产研究所级基本科研业务费(20603022016003)和国家国际科技合作专项项目(2013DFA31410)共同资助 [This work was supported by China Agricultural Research System (CARS-50), Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022016003), and International S&T Cooperation Program of China (2013DFA31410)].
徐永江, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-07-22, 收修改稿日期: 2013-08-24

(Hamel *et al.*, 2012)。在牙鲆标志放流技术方面, 我国已开展了体外挂牌标记、耳石标记等研究(刘奇, 2009¹⁾; 刘芝亮等, 2013), 但体外挂牌标记存在对小规格苗种操作损伤大、放流苗种易被捕食等问题, 耳石染色存在标记不易检测、易消褪等问题。因此, 亟待开发更为有效的标记方式用于牙鲆小规格苗种标志放流和效果评价。

编码金属标签(Coded-wire tag, CWT)于 20 世纪 60 年代开始应用于鲑鳟鱼类的标志放流(Jeffers *et al.*, 1963), 因其具有体积小、易操作、精确度与回收率高等优点, 成为应用最为广泛的标志方式(张堂林等, 2003; Simon *et al.*, 2011)。CWT 标志技术已在 30 多种鱼类的增殖放流和资源管理中应用, 特别是在鲑鱼资源管理领域取得了较为显著的成就(Lorenzen *et al.*, 2010; Mohr *et al.*, 2013; Ashton *et al.*, 2014; Hinrichsen *et al.*, 2016)。我国近年来开始应用 CWT 标记放流鱼类, 但仅在达乌尔鳊(*Huso dauricus*) (杨晓鸽等, 2013)、鳊鱼(*Siniperca chuatsi*) (张彬等, 2007)、蒙古鲌(*Culter mongolicus*) (Lin *et al.*, 2012)等少数几种鱼类中进行了研究, 尚未见对鲆鲽鱼类标记效果的报道。本研究以鲆鲽鱼类典型鱼种——牙鲆为研究对象, 测试了 CWT 对 3 种规格牙鲆苗种的标记效果, 以期为开发牙鲆标志放流新标记技术及增殖效果评价提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 实验鱼来源

本实验于 2014 年 7–9 月在山东青岛贝宝海洋科技有限公司进行。实验用鱼为该养殖场人工培育的牙鲆苗种, 苗种色泽正常、大小规格整齐、健康活泼、摄食良好。本年度苗种培育所用受精卵来自于同一批野生亲鱼, 苗种由产卵周期中 3 批次受精卵培育而来。

按照苗种规格的不同设置 3 个实验组: 小规格组、中规格组和大规格组, 每组设置 1 个对照和 2 个重复。随机选取不同规格苗种 30 尾, 分别测定全长

(TL)和体重(BW), 同时利用游标卡尺测定体厚度(BT), 计算全长与体重间的回归关系式:

小规格组: $TL = -1.4761 BW^2 + 5.7679 BW + 0.6117$ ($R^2 = 0.9521$)

中规格组: $TL = 2.4064 BW^2 - 25.8520 BW + 77.5880$ ($R^2 = 0.8918$)

大规格组: $TL = 0.1159 BW^2 - 3.0596 BW + 32.145$ ($R^2 = 0.9692$)

实验开始前, 为减少单尾鱼生长参数测量带来的人为操作胁迫, 各对照组和实验组的苗种分 3 批次测定总体重, 根据得到的回归关系式, 计算各对照组和实验组全长数据。实验用苗种数量与规格见表 1。

不同规格组的苗种于实验前 3 d 分别放入体积为 1 m³ 的方形抹角水泥池中暂养。实验用水为砂滤海水, 池内水深为 60–70 cm, 水温为 25–27℃、盐度为 27–29、pH 为 7.8–8.2、溶解氧 6 mg/L 以上。暂养期间, 投喂配合饲料, 饱食投喂, 每日清理培育池 1 次。

1.2 CWT 标记操作方法

本研究所用 CWT 系统购自美国西北海洋技术公司(NMT 公司, 美国), 标签直径为 0.25 mm, 长度为 1 mm (图 1, 右图), 利用配套的标记器进行标记操作(图 1, 左图上)。标记器针头外径为 0.47 mm, 内径为 0.3 mm。

实验鱼标记操作前饥饿 24 h。CWT 标记操作前, 所有实验鱼都以 MS-222 进行麻醉, 小规格、中规格和大规格苗种的适宜麻醉剂量分别为 30 mg/L、50 mg/L 和 80 mg/L。

将麻醉的苗种置于湿润的毛巾上进行标记操作。CWT 标记部位在背部肌肉(侧线弧后肌肉最厚处, 背鳍基部下方向约 5 个鳞片处, 标记方向与鳞片同向)(图 2)。由受过专门技术培训的人员进行标记操作。标记时, 将标记器与鱼体呈 45°角, 使针头自鳞下间隙处斜向插入, 斜入肌肉 2–3 mm 深度, 轻轻推动撞针将标签推入鱼体内。标记后, 使用系统自带探测器

表 1 实验用牙鲆苗种规格与标记部位

Tab.1 Sizes and the tagging positon of the experimental *P. olivaceus*

实验组别 Experimental groups	全长 Total length (cm)	体重 Body weight (g)	体厚度 Body thickness (mm)	标记部位 Tagging position
小规格组 Small-size group	5.92±0.41	1.47±0.11	2.68±0.23	背部肌肉 Dorsal muscle
中规格组 Medium-size group	8.92±0.36	6.13±0.24	4.22±0.09	背部肌肉 Dorsal muscle
大规格组 Large-size group	12.06±0.62	14.32±1.36	6.39±0.41	背部肌肉 Dorsal muscle

1) Liu Q. Japanese flounder marking techniques and juveniles released for stock enhancement. Master's Thesis of Ocean University of China, 2009 [刘奇. 褐牙鲆标志技术与增殖放流试验研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2009]

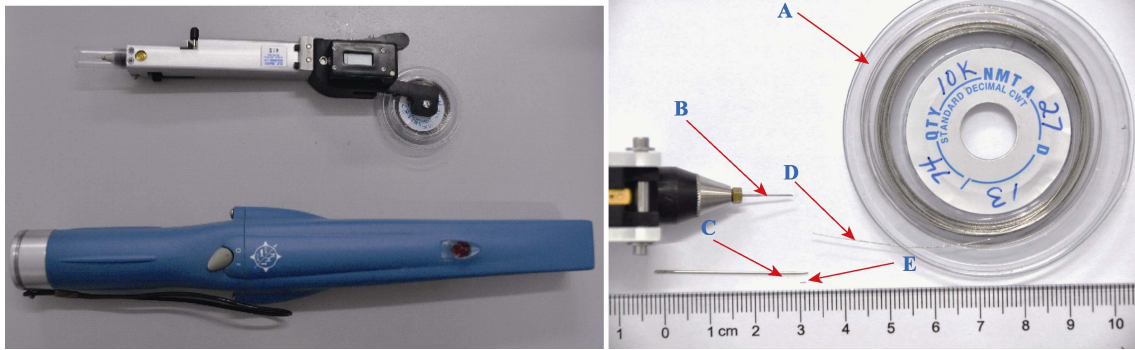


图 1 CWT 标签标记器(左图上)、探测器(左图下)与标签系统组成(右图)
Fig.1 The CWT injector (left upper), detector (left bottom) and coded wire tagging system (right)

A. 标签盘; B. 标记器针头; C. 撞针; D. 未切断的标签; E. 单个标签
A. Tag cartilage; B. Injector syringe needle; C. Firing pin; D. Whole tagging system; E. Single tag

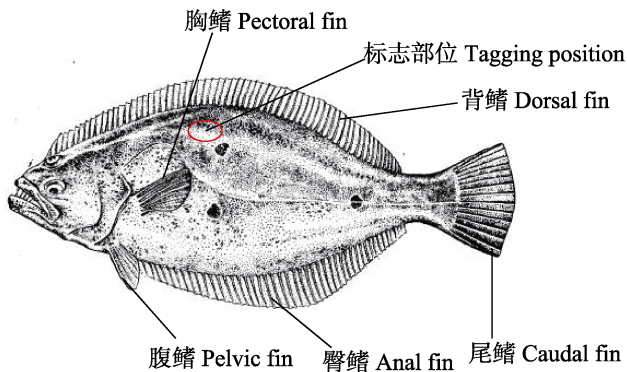


图 2 牙鲆苗种 CWT 背部肌肉标记示意
Fig.2 The schematic diagram of CWT tagging position in the dorsal muscle of *P. olivaceus* juveniles

(图 1, 左图下)扫描被标记鱼标签部位, 确认标签植入鱼体。苗种标记后, 迅速置于洁净的海水中复苏。

1.3 标记苗种成活率和脱标率检测

标记操作完成后, 各实验组分别选取 100 尾成功标记并可在 3 min 内复苏的苗种, 继续在原池内养殖, 养殖时间为 30 d。养殖条件同 1.1, 日换水率为 300%。暂养期间投喂配合饲料, 投喂量为鱼体重的 3%–5%。

标记苗种养殖期间, 观察标记苗种的游泳行为、摄食行为。在 1 d、5 d、15 d 和实验结束时, 使用探测器检测各实验组的 CWT 脱标情况, 及时拣出脱标和死亡的苗种, 并记录全长、体重等数据, 对死亡苗种检测 CWT 标签是否脱落, 计入成活率和脱标率。

1.4 CWT 标记对苗种生长的影响

在养殖结束时, 测量标记苗种的全长和体重, 计算特定增长率(SGR), 通过与对照组苗种 SGR 的对比分析, 评估 CWT 标记对实验鱼生长的影响, 计算方法:

$$SGR = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{\Delta t} \times 100$$

式中, W_1 为起始个体体重, W_2 为实验结束后个体体重, Δt 为实验持续时间。

1.5 统计分析

实验用牙鲆苗种的生长数据表示为平均值±标准差(Mean±SD), 实验苗种死亡率、脱标率、累计死亡率等数据均为各规格实验组 2 个平行的平均值。利用单因素方差分析(One-way ANOVA)统计各组实验苗种死亡率、脱标率、生长的差异显著性。利用相关性分析研究标记苗种全长、体厚度与死亡率的关系。统计分析使用 SPSS 16.0 软件, 设置显著性水平 $P=0.05$, 当 $P<0.05$ 时为差异显著。

2 结果

2.1 CWT 标记对苗种行为与摄食的影响

在进行 CWT 标记后, 不同规格的苗种都可在 3 min 内在清洁海水中苏醒, 并正常游动, 表明麻醉剂剂量和标记操作方法适宜。中规格和大规格苗种在标记后的第 2 天即可正常跃起摄食。小规格苗种在标记后的第 3 天恢复正常摄食。

2.2 苗种规格与 CWT 标记死亡率及脱标率的关系

本研究发现, CWT 脱标均发生在标记后的 4 d 内, 且整个实验过程中只有小规格苗种脱标率最高(3.3%), 中规格苗种的脱标率为 2.4%, 而大规格苗种仅为 0.7% (表 2)。

用 CWT 标记后, 小规格苗种的死亡率最高(13%) ($P<0.05$), 中规格和大规格苗种标记的死亡率分别为 2% 和 1%。相关性分析表明, 标记死亡率(M)与苗种

全长(TL)的关系符合模型: $M=0.7254TL^2-15.3220 TL+79.4260$ ($R^2=0.9601$) (图 3); 标记死亡率(M)与鱼体厚度(BT)的关系符合模型: $M=1.3627 BT^2-15.5610 BT+44.4330$ ($R^2=0.9645$) (图 4)。

2.3 CWT 标记对实验鱼生长的影响

CWT 标记后, 各实验组的牙鲈苗种经 30 d 的培育, 全长、体重和 SGR 变化结果见表 2。各实验组全长和体重生长与各自对照组差异不显著($P>0.05$)。小规格实验组苗种的 SGR 为 0.035, 其对照组 SGR 为 0.037; 中规格实验组苗种的 SGR 为 0.015, 其对照组 SGR 为 0.017; 大规格实验组苗种的 SGR 为 0.012, 其对照组为 0.009。小规格组的 SGR 值最低, 中规格组的 SGR 最高, 但同规格实验鱼对照组与实验组 SGR 水平差异不显著($P>0.05$), 表明 CWT 标记对本实验中不同规格的牙鲈苗种全长和体重生长影响不显著。

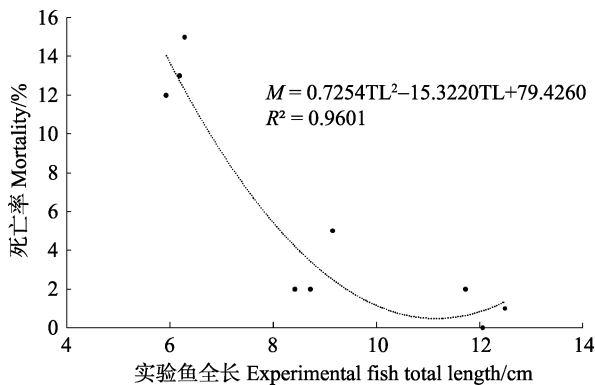


图 3 牙鲈苗种 CWT 标记死亡率与全长的关系
Fig.3 The relationship between mortality and the total length of CWT tagged *P. olivaceus* juveniles

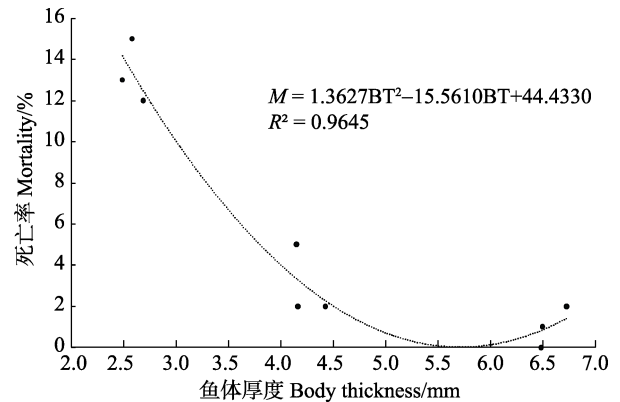


图 4 牙鲈苗种 CWT 标记死亡率与苗种体厚度的关系
Fig.4 The relationship between mortality and the body thickness of CWT tagged *P. olivaceus* juveniles

3 讨论

3.1 CWT 标记操作方法

自 20 世纪 60 年代以来, 研究者们已在多种鲑形目、鲈形目和鳗鲡目等鱼类标志放流中应用 CWT 标签, 表明 CWT 可用于标记小规格实验鱼且标签保持率高, 是一种理想的标志方式(van Den Avyle *et al*, 2001; Brennan *et al*, 2007), 但尚未见 CWT 在鲽形目鱼类上应用的研究报道。本研究利用长度为 1 mm 的 CWT 标签, 斜向埋植入牙鲈肌肉厚度最大的背部肌肉部位, 进入鱼体内 2-3 mm 但并未穿透鱼体, 标记成功率、标记苗种成活率和标签保持率均较高, 表明本研究建立的 CWT 标记操作方法适宜于牙鲈等体侧扁鱼类。

标记部位的选择对于标记成功率影响较大, 特别

表 2 各实验组牙鲈苗种的生长、死亡率及脱标率
Tab.2 The growth, mortality and tag shedding rate of *P. olivaceus* juveniles

组别 Groups	死亡率 Mortality (%)	脱标率 Tag shedding rate (%)	实验开始 全长 Initial total length (cm)	实验开始体重 Initial body weight(g)	实验结束 全长 Final total length (cm)	实验结束体重 Final body weight (g)	特定生长 率 SGR (%/d)
小规格对照组 Small-size control group	2.0	-	5.84±0.56	1.39±0.25	7.19±0.52	4.19±0.12	0.037
小规格实验组 Small-size experimental group	13.0	3.3	5.92±0.41	1.47±0.11	7.07±0.63	4.16±0.15	0.035
中规格对照组 Medium-size control group	0	-	9.24±0.17	6.71±0.51	11.51±0.48	10.43±0.30	0.015
中规格实验组 Medium-size experimental group	2.0	2.4	8.92±0.36	6.13±0.24	11.29±0.58	10.18±0.29	0.017
大规格对照组 Large-size control group	0	-	11.76±0.21	13.83±1.02	15.02±0.89	19.55±1.49	0.012
大规格实验组 Large-size experimental group	1.0	0.7	12.06±0.62	14.32±1.36	14.33±0.56	18.75±1.23	0.009

是对规格较小的鱼类尤为重要。在对鳊鱼的 CWT 标记研究中,研究者对其 3 个不同的部位进行了标记,并发现不同部位标记成活率等无显著差异,但以背部肌肉标记最为方便(张彬等, 2007)。CWT 标记达乌尔鳊背部前、中、后部肌肉的标志保持率都可达 92% 以上,也表明背部肌肉是较为适宜的标记部位(杨晓鸽等, 2013)。其他一些游泳性鱼类如斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、蓝鳃太阳鱼(*Lepomis macrochirus*)、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)、金体美鲮(*Notemigonus crysoleucas*)等,由于身体肌肉厚度较大,可选择颊部、腹壁和鼻软骨等部位进行标记,标志保持率在 91%–100% 之间(Heidinger *et al*, 1998)。本研究选择背部肌肉作为标记部位,取得了较好的标记效果。另外,还测试了牙鲈颞弓提肌的 CWT 标记,结果显示,其脱牌率达 8%,死亡率也达 22%(未发表数据),表明相比较而言,背部肌肉是牙鲈等体扁平鱼类进行 CWT 标记操作的理想部位。

3.2 适宜苗种规格选择与标记后暂养时间

CWT 标签作为一种内部标记,可稳定附着在实验鱼肌肉内,避免了标记鱼因外部标记而易被捕食的风险,可大大提高标记放流苗种的成活率。即使是小规格苗种,利用 CWT 标记后,也不会影响苗种的游泳与摄食行为(张彬等, 2007; Mohr *et al*, 2013)。与其他游泳性鱼类不同的是,鲟鳇鱼类双眼位于身体一侧,且体型较侧扁,肌肉厚度较薄,标记难度较大,容易造成较高的脱标率和死亡率。本研究也发现,全长为 5–6 cm 的牙鲈苗种在 CWT 标记后出现了相对较高的死亡率(13%),但较 T 型标志牌标记,CWT 标记成活率明显提高(刘芝亮等, 2013),表明其特别适合牙鲈小规格苗种标记。而利用 CWT 标记全长 8.9 cm 以上苗种时,成活率可达 98% 以上。本研究还发现,CWT 标记牙鲈苗种后,各规格标记苗种与对照组苗种生长无差异,表明 CWT 标记没有对苗种生长产生明显影响,这与其他鱼类如蒙古鲌、鳊鱼等的研究结果类似(Heidinger *et al*, 1998; 张彬等, 2007; Lin *et al*, 2012)。另外,先前的研究也证实,由于 CWT 体积较小,标记创口微小,并且可在较短时间内愈合,组织兼容性较好,因此对鱼体的胁迫也小(Munro *et al*, 2003; Brennan *et al*, 2005)。综合考虑标记后成活率、脱标率等因素,今后在应用 CWT 标签标记牙鲈苗种时,苗种规格应达到全长 6 cm 以上。

目前,国际上多在实验室条件下预先测试不同的标志对水生生物的标记效果,标记后实验动物暂养时间越长,对于标记效果的评价就越可靠(Brattey *et al*,

2004)。本研究发现,CWT 标记不同规格牙鲈苗种后,脱标率低于 3.3%,且脱标都发生在标记后 4 d 内。CWT 标记鳊鱼的研究表明,在 CWT 标记 29 d 内,标签保存率达 97.9%,而在其后 29–333 d 实验期间内,标签保存率为 100%(张彬等, 2007)。对欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)、北极红点鲑(*Salvelinus alpinus*)幼鱼的 CWT 标志技术研究中,CWT 标签脱落一般都发生标记后 21 d 内,其后不再出现脱标的情况(Thomassen *et al*, 2000; Kolari *et al*, 2006)。综合目前已有的鱼类 CWT 标记后暂养时间,本研究采用标记后暂养时间为 30 d,完全可以实现对牙鲈幼鱼 CWT 标记的存活率和标签保持率的准确评价。

3.3 标记死亡率与苗种规格的关系

本研究发现,牙鲈苗种规格与标记成活率关系较为密切,小规格苗种(表 1, 体厚度仅为 2.5–2.9 mm)出现了相对较高的死亡率(13%),而中规格和大规格实验鱼死亡率低,表明苗种标记死亡率具有鱼体规格依赖性的特点,这在其他一些鱼类的 CWT 标记实验中也类似结果,如对蒙古鲌的 CWT 标记实验表明,小规格苗种在 CWT 标记后死亡率较高(Lin *et al*, 2012)。小规格苗种的标记死亡率可能与胁迫耐受性、体厚度等因素有关,具体原因有待于进一步分析确定。Lin 等(2012)提出,建立实验鱼规格与标记成活率的评价模型,对于指导 CWT 的批量化应用具有重要意义。本研究建立了 CWT 标记牙鲈苗种的标记死亡率与全长、体厚度的数学评价模型,可为牙鲈标志放流时适宜标记苗种规格选择提供参考和技术支持。CWT 标签由专门的设备进行检测(图 1, 左图下),灵敏度高,对带标实验鱼的检出率达 100%,检出效果好,适宜在今后大规模标志放流中应用。

参 考 文 献

- Ashton NK, Anders PJ, Young SP, *et al*. Coded wire tag and passive integrated transponder tag implantations in juvenile Burbot. *North American Journal of Fisheries Management*, 2014, 34(2): 391–400
- Bell JD, Leber KM, Blankenship HL, *et al*. A new era for restocking, stock enhancement and sea ranching of coastal fisheries resources. *Reviews in Fisheries Science*, 2008, 16(1–3): 1–9
- Brattey J, Cadigan N. Estimation of short-term tagging mortality of adult Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fisheries Research*, 2004, 66(2–3): 623–633
- Brennan NP, Leber KM, Blackburn BR, *et al*. Use of coded-wire and visible implant elastomer tags for marine stock

- enhancement with juvenile red snapper *Lutjanus campechanus*. *Fisheries Research*, 2007, 83(1): 90–97
- Brennan NP, Leber KM, Blankenship HL, *et al.* An evaluation of coded wire and elastomer tag performance in juvenile common snook under field and laboratory conditions. *North American Journal of Fisheries Management*, 2005, 25(2): 437–445
- Cheng JH, Jiang YZ. Marine stock enhancement: Review and prospect. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(3): 610–617 [程家骅, 姜亚洲. 海洋生物资源增殖放流回顾与展望. *中国水产科学*, 2010, 17(3): 610–617]
- Cheng WW, Wang DQ, Wei QW, *et al.* Effect of restocking enhancement of Chinese sucker in the middle and upper reaches of Yangtze River based on microsatellite loci. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(3): 574–580 [成为为, 汪登强, 危起伟, 等. 基于微卫星标记对长江中上游胭脂鱼增殖放流效果的评估. *中国水产科学*, 2014, 21(3): 574–580]
- Hamel M, Hammen J, Pegg M, *et al.* Tag retention of T-bar anchor tags and passive integrated transponder tags in Shovelnose sturgeon. *North American Journal of Fisheries Management*, 2012, 32(3): 533–538
- Heidinger R, Cook S. Use of coded wire tags for marking fingerling fishes. *North American Journal of Fisheries Management*, 1998, 8(2): 268–272
- Hinrichsen RA, Steele CA, Ackerman MW, *et al.* Maximum likelihood estimation of the proportion of hatchery-origin fish on spawning grounds using coded wire tagging and parentage-based tagging. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2016, 145(3): 671–686
- Jeffers B, Bergman K, Fiscus F, *et al.* A coded-wire identification system for macro-organisms. *Nature*, 1963, 198(4879): 460–462
- Jiang YZ, Lin N, Liu ZL, *et al.* Effectiveness of *Nibeia albiflora* stock enhancement in Xiangshan Bay and prioritization of fishing strategy for the released stock. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(3): 641–647 [姜亚洲, 林楠, 刘尊雷, 等. 象山港黄姑鱼增殖放流效果评估及增殖群体利用方式优化. *中国水产科学*, 2016, 23(3): 641–647]
- Kolari I, Hirvonen E. Long-term retention of coded wire tags in juvenile Arctic charr *Salvelinus alpinus*. *Fisheries Management and Ecology*, 2006, 13(3): 143–148
- Lin ML, Xia YG, Murphy BR, *et al.* Size-dependent effects of coded wire tags on mortality and tag retention in redbtail culter *Culter mongolicus*. *North American Journal of Fisheries Management*, 2012, 32(5): 968–973
- Liu ZL, Xu YJ, Liu XZ, *et al.* Tagging of Japanese flounder using T bar tags. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(6): 80–86 [刘芝亮, 徐永江, 柳学周, 等. T 型标志牌标记牙鲆苗种. *渔业科学进展*, 2013, 34(6): 80–86]
- Lorenzen K, Leber M, Blankenship L, *et al.* Responsible approach to marine stock enhancement: An update. *Reviews in Fisheries Science*, 2010, 18(2): 189–210
- Mohr MS, Satterthwaite WH. Coded-wire tag expansion factors for chinook salmon carcass surveys in California: Estimating the numbers and proportions of hatchery-origin fish. *San Francisco Estuary and Watershed Science*, 2013, 11(4): 1–19
- Munro AR, McMahon TE, Leathe SA, *et al.* Evaluation of batch marking small rainbow trout with coded wire tags. *North American Journal of Fisheries Management*, 2003, 23(2): 600–604
- Shan XJ, Jin XS, Li ZY, *et al.* Fish community structure and stock dynamics of main releasing fish species in the Bohai Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(6): 1–9 [单秀娟, 金显仕, 李忠义, 等. 渤海鱼类群落结构及其主要增殖放流鱼类的资源量变化. *渔业科学进展*, 2012, 33(6): 1–9]
- Simon J, Dörner H. Growth, mortality and tag retention of small *Anguilla anguilla* marked with visible implant elastomer tags and coded wire tags under laboratory conditions. *Journal of Applied Ichthyology*, 2011, 27(1), 94–99
- Thomassen S, Pedersen MI, Holdensgaard G. Tagging the European eel *Anguilla anguilla* (L.) with coded wire tags. *Aquaculture*, 2000, 185(1–2): 57–61
- van Den Avyle MJ, Wallin JE. Retention of internal anchor tags by juvenile striped bass. *North American Journal of Fisheries Management*, 2001, 21(3): 656–659
- Wu HZ, Ruan HC, Wang XC, *et al.* Studies on the ecological basis of resources multiplication and stocking experiment on the false halibut *Paralichthys olivaceus* in Jiaozhou Bay. *Marine Sciences*, 1987, 11(6): 52–53 [吴鹤洲, 阮洪超, 王新成, 等. 胶州湾牙鲆资源增殖的生态学基础及种苗放流实验研究. *海洋科学*, 1987, 11(6): 52–53]
- Yang XG, Wei QW, Du H, *et al.* Primary study on tag performance of Kaluga sturgeon (*Huso dauricus*) tagged with visible implant elastomer and coded wire tag. *Freshwater Fisheries*, 2013, 43(2): 43–47 [杨晓鸽, 危起伟, 杜浩, 等. 可见植入荧光标记和编码金属标对达乌尔鲟标志效果的初步研究. *淡水渔业*, 2013, 43(2): 43–47]
- Zhang B, Li ZJ. Tagging juvenile mandarin fish *Siniperca chuatsi* (Basilewsky) with coded wire tag. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(7): 53–60 [张彬, 李忠杰. 微型金属标标记鳊稚鱼. *中国水产科学*, 2007, 14(7): 53–60]
- Zhang TL, Li ZJ, Shu SW. A review on marking techniques in fish. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2003, 10(3): 246–253 [张堂林, 李钟杰, 舒少武. 鱼类标志技术的研究进展. *中国水产科学*, 2003, 10(3): 246–253]

Tagging Juvenile Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) with Coded Wire Tags

XU Yongjiang^{1,2}, LIU Xuezhou^{1,2}①, ZHANG Kai³, LAN Gonggang³, SHI Bao^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. Qingdao Beibao Marine Science and Technology Co., Ltd., Qingdao 266400)

Abstract In this study we tested the feasibility of coded wire tags (CWTs) as a novel high-efficiency tagging method for Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). A total of three size groups were tested. The total lengths for small, medium, and large size groups were (5.92±0.41) cm, (8.92±0.36) cm, and (12.06±0.62) cm respectively. In a short-term experiment, we marked hatchery-reared juveniles with CWTs in the dorsal muscle and examined whether the fish size affected the tag retention and tagging-induced mortality. Tag retention was above 96% in all the three size groups and appeared to be unaffected by the fish size. Tag loss was only observed within 4 days post tagging. Tagging-induced mortality for small juveniles (13%) was significantly higher than that for the medium (4%) and the large (1%) juveniles. The tag shedding rates for the small, medium, and large juveniles were 3.3%, 2.4%, and 0.7% respectively. Linear dependence models were established to describe the relationships of tagging-induced mortality, the total length, and the body thickness. Death of small marked juveniles usually occurred within 4 days post tagging. In order to reduce the post-tagging mortality and biases in stocking assessment, we recommended CWT tagging on juveniles at least 6 cm in body length. The CWT tagging may have no effects on the growth and swimming behavior of the fish, therefore could be an ideal tagging method for Japanese founder juveniles. It is potentially a good tool in large-scale tagging and evaluation of Japanese flounder in the future.

Key words Coded wire tags; Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*); Tagging effects; Evaluation model

① Corresponding author: LIU Xuezhou, Email: liuxz@ysfri.ac.cn

《渔业科学进展》编辑委员会

THE EDITORIAL BOARD OF *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*

主 编 Editor-in-Chief 唐启升 TANG Qisheng

副主编 Associate Editors-in-Chief 金显仕 JIN Xianshi 麦康森 MAI Kangsen 孙 松 SUN Song 孔 杰 KONG Jie

顾 问 Advisors (以姓名笔画为序)

苏纪兰 SU Jilan 林浩然 LIN Haoran 赵法箴 ZHAO Fazhen 徐 洵 XU Xun

曹文宣 CAO Wenxuan 雷霖霖 LEI Jilin 管华诗 GUAN Huashi

编 委 Editorial Committee (以姓名笔画为序)

于志刚 YU Zhigang	戈贤平 GE Xianping	方建光 FANG Jianguang	王清印 WANG Qingyin
王新鸣 WANG Xinming	包振民 BAO Zhenmin	司徒建通 SITU Jiantong	关瑞章 GUAN Ruizhang
刘占江 LIU Zhanjiang	刘海金 LIU Haijin	孙效文 SUN Xiaowen	孙 溢 SUN Mi
庄 平 ZHUANG Ping	曲克明 QU Keming	江世贵 JIANG Shigui	何建国 HE Jianguo
吴常文 WU Changwen	吴淑勤 WU Shuqin	张士璀 ZHANG Shicui	张全启 ZHANG Quanqi
张国范 ZHANG Guofan	张显良 ZHANG Xianliang	李来好 LI Laihao	李杰人 LI Jieren
李 健 LI Jian	李家乐 LI Jiale	杨红生 YANG Hongsheng	邹桂伟 ZOU Guiwei
陈立侨 CHEN Liqiao	陈松林 CHEN Songlin	陈雪忠 CHEN Xuezhong	周永灿 ZHOU Yongcan
林 洪 LIN Hong	俞志明 YU Zhiming	姚 杰 YAO Jie	相建海 XIANG Jianhai
赵宪勇 ZHAO Xianyong	徐 皓 XU Hao	桂建芳 GUI Jianfang	殷邦忠 YIN Bangzhong
秦 松 QIN Song	贾晓平 JIA Xiaoping	常亚青 CHANG Yaqing	常剑波 CHANG Jianbo
黄 健 HUANG Jie	董双林 DONG Shuanglin	翟毓秀 ZHAI Yuxiu	魏宝振 WEI Baozhen

渔 业 科 学 进 展

YUYE KEXUE JINZHAN

(双月刊, 1980年创刊)

第38卷 第1期 2017年2月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.38 No.1 Feb. 2017

主管单位 中华人民共和国农业部

主办单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所
中国水产学会

出版单位 科学出版社

地址: 北京东黄城根北街16号, 邮编: 100717

编辑单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所

地址: 青岛市南京路106号 邮编: 266071

电话: 0532-85833580

<http://www.yykxjz.cn>

E-mail: yykxjz@ysfri.ac.cn

主 编 唐启升

印 刷 青岛国彩印刷有限公司

国内发行 中国邮政集团公司山东省分公司

订 购 全国各地邮政局

国外发行 中国国际图书贸易总公司

地址: 北京339信箱 邮编: 100044

Administrated

by Ministry of Agriculture, P.R.China

Sponsored

by Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences
China Society of Fisheries

Published

by Science Press

Add: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China

Edited

by Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences

Add: 106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580

<http://www.yykxjz.cn>; E-mail: yykxjz@ysfri.ac.cn

Editor-in-Chief

Tang Qisheng

Printed

by Qingdao Guocai Printing Co., Ltd.

Domestic Distributed

by China Post Group Corporation Shandong Branch

Subscription

Post Offices All Over China

Overseas Distributed

by China International Book Trading
Corporation

P.O.Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号

ISSN 2095-9869

CN 37-1466/S

国内邮发代号: 24-153

国外发行代号: 4578Q

国内外公开发行

定 价: 30.00元

ISSN 2095-9869



9 772095 986170