

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*)和半滑舌鳎(*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); 根据半滑舌鳎基因组测序结果(Chen *et al.*, 2014), 其 *mPRL* 基因定位在 18 号染色体上。

针对半滑舌鳎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)研究了半滑舌鳎功能基因 *mPRL* 表达规律, 发现在半滑舌鳎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鳎 *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* 在半滑舌鳎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鳎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。按照半滑舌鳎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鳎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。

在半滑舌鳎繁殖季节, 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

分别从半滑舌鳎 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'-TGCC-TCGTCCAGCGTCACT-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]

ATTATTCCGCT-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。

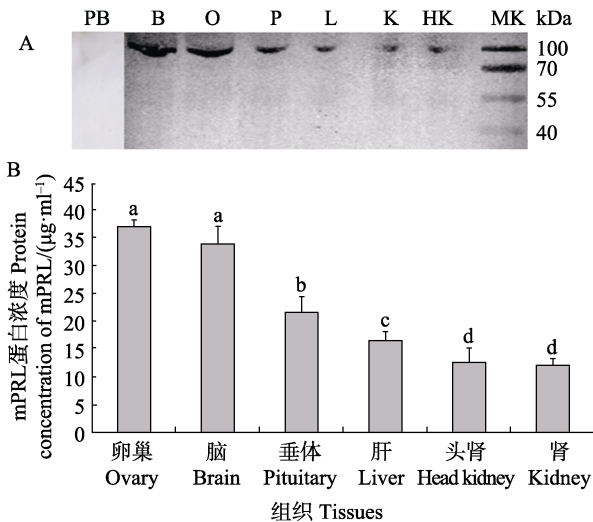


图 1 半滑舌鳎各组织 mPRL 蛋白的表达
Fig.1 Expression of mPRL protein in different tissues detected by Western blotting

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

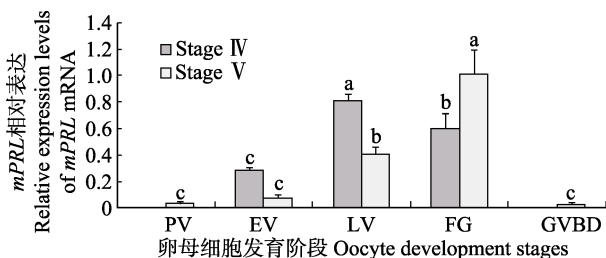


图 2 半滑舌鳎不同卵巢发育时期的不同时相卵母细胞 mPRL 基因的表达

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

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

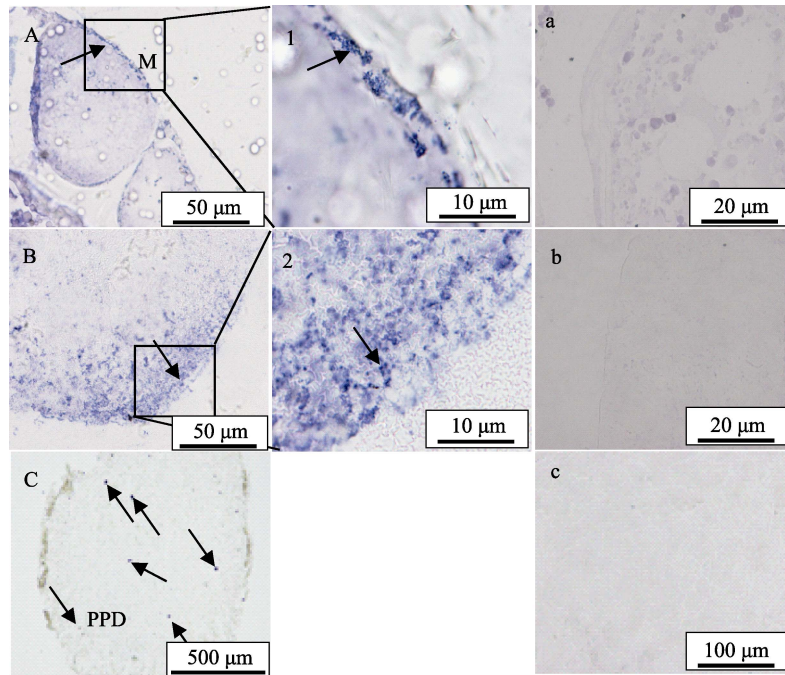


图 3 半滑舌鳎 *mPRL* 基因在不同组织中的细胞学定位

Fig.3 Localization of *mPRL* mRNA in different tissues of *C.semilaervis* 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

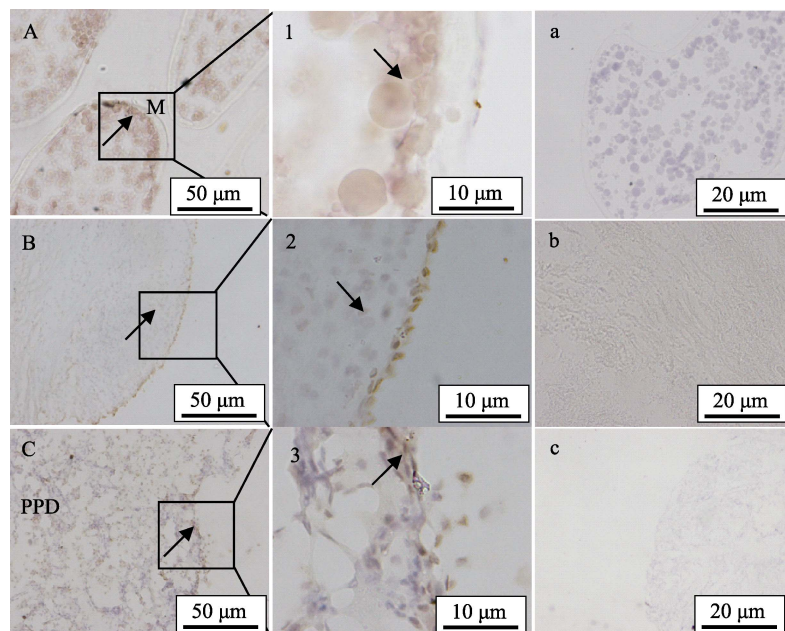


图 4 半滑舌鳎 *mPRL* 蛋白在各组织中的细胞定位

Fig.4 Localization of *mPRL* protein in the ovary, brain and pituitary of *C.semilaervis* 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

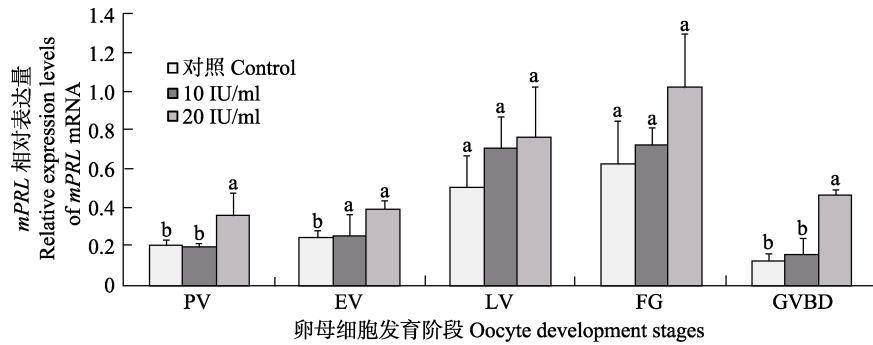


图 5 不同浓度促性腺激素调控半滑舌鳎不同时相卵母细胞 *mPRL* 表达

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

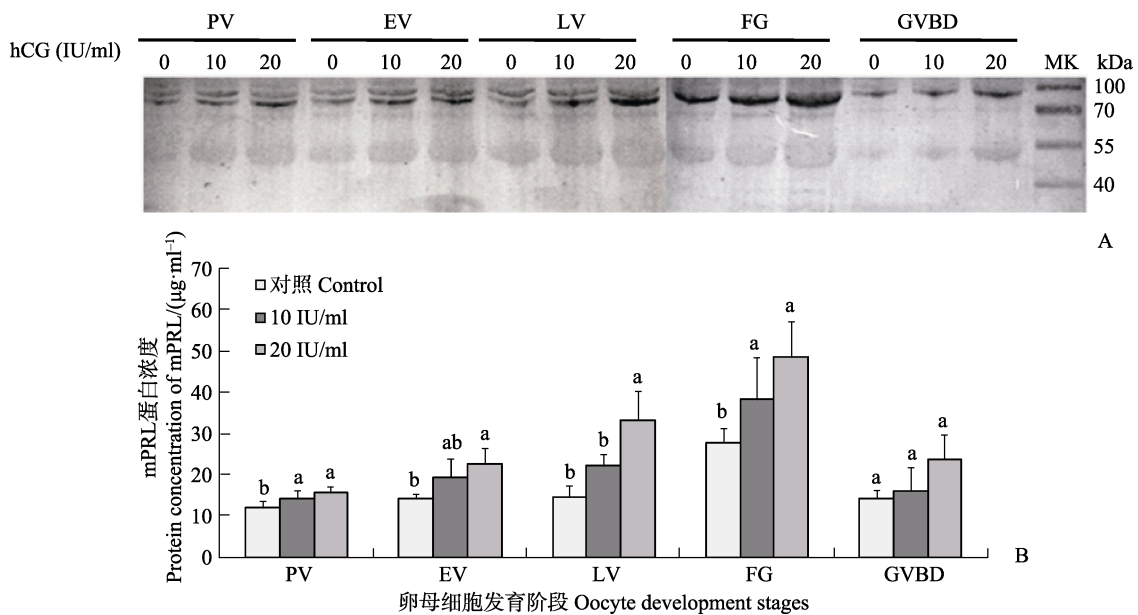


图 6 不同浓度促性腺激素调控不同时相卵母细胞 *mPRL* 蛋白表达

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: Electrophoretogram 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, *mPRL* 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 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*, 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 progesterone actions and progesterone 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 progesterone 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 progesterone 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 马耀艳)

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

SHI Bao^{1,2}, LIU Xuezhou^{1,2①}, 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 progesterone 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