

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	ATCTCAAACGACT GGTTGACTCC	<i>GH</i>	209
GH-RT-R	TTGCCGCCAGGTT CTCATAG		
IGF1-RT-F	GTGGCATTCTGGG ATGTTC	<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)。

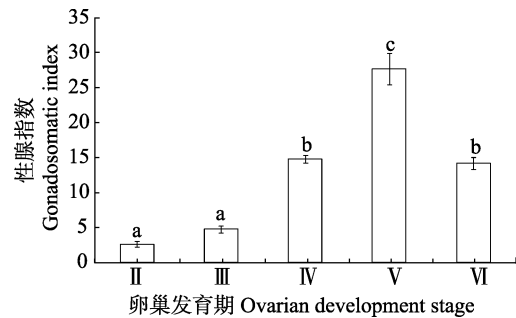


图 1 卵巢不同发育时期的性腺指数

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)。

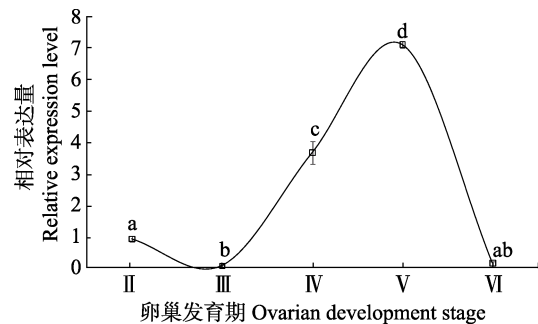


图 2 卵巢不同发育时期垂体中 *GH* mRNA 的表达水平变化

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($P<0.05$),

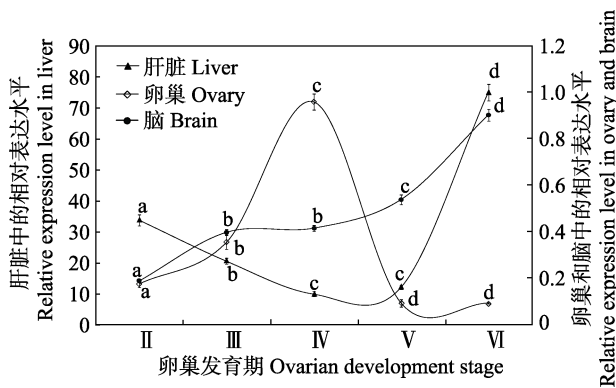


图3 肝脏、卵巢和脑中 IGF- I mRNA 在卵巢不同发育时期的表达水平变化

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)。

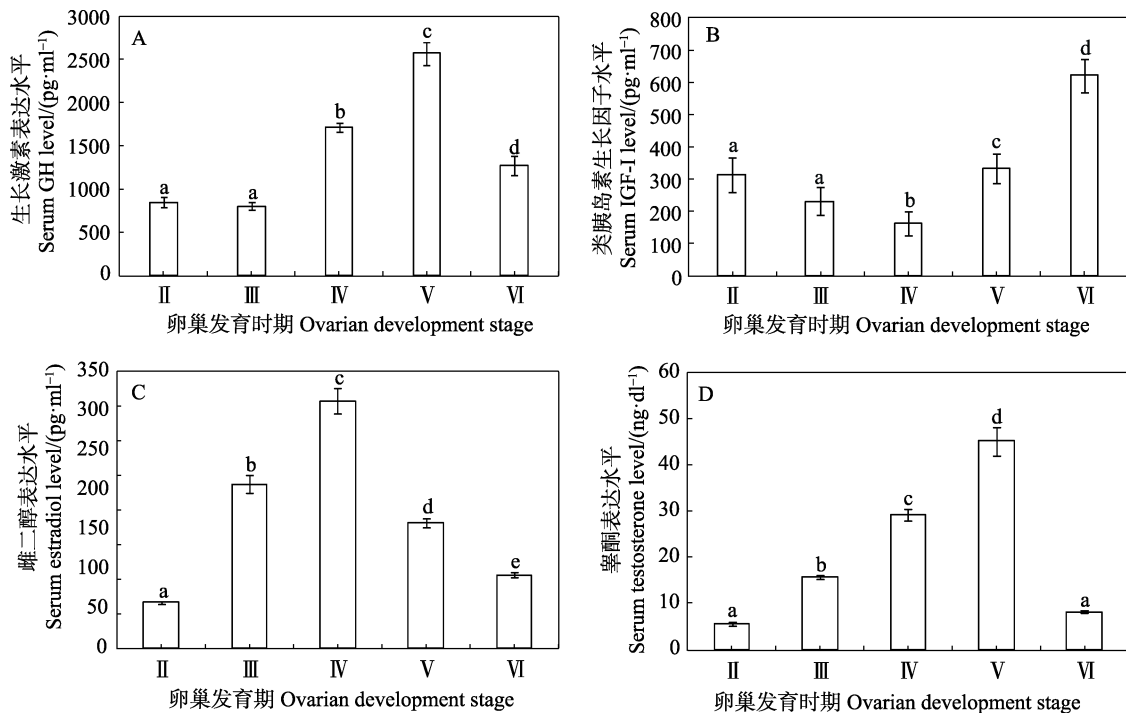


图4 卵巢不同发育时期血清中 GH、IGF- I、E2 和 T 表达水平

Fig.4 The serum GH, IGF- I, E2 and T expression levels at different ovarian development 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)对大鳍鱯(*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