

半滑舌鳎促滤泡激素受体基因克隆及其在雌鱼生殖周期中的表达

陈晓燕, 温海深*, 何峰, 李吉方, 陈彩芳,
张葭人, 金国雄, 史宝, 史丹, 杨艳平
(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 通过简并引物扩增及 RACE 技术, 首次克隆了半滑舌鳎促滤泡激素受体(FSHR) 基因 cDNA 全长序列。该基因全长 3 105 bp, 编码 704 个氨基酸, 含有典型的跨膜螺旋结构区域(TM helix), 属于糖蛋白激素受体(GHR) 家族。该基因编码区共有 19 个 Ser, 4 个 Thr 和 5 个 Tyr 磷酸化位点; 3 个潜在的 N 基端糖基化位点, 分别是⁶²NISS, ²²⁶NGIK 和³⁵⁶NSTS; ⁴⁴¹T 为潜在的 PKC 位点。基酸序列比对结果表明, 半滑舌鳎 FSHR 含有 GpHR 家族的特殊信号序列, 如⁸²CCAF, ⁴⁸¹ERW, ⁵⁹⁴FTD 和⁶⁶⁷NPFLY, 含有 10 个 LRRs(LRR1-10)。组织表达分析表明, FSHR 表达广泛, 除在性腺中大量表达外, 其他非性腺组织也有表达, 尤其以脾、肾、头肾表达最较高。采用¹²⁵I 标记放射免疫分析法(RIA)测定雌鱼血清中 E₂ 含量的季节变化, 发现 4 月时 E₂ 含量最低, 10 月时含量最高。卵巢中 FSHR mRNA 在 10 月表达量最高, 1 月最低。

关键词: 半滑舌鳎; 促滤泡激素受体; 基因克隆; mRNA 表达; 雌二醇

中图分类号: S 917

文献标识码: A

促性腺激素(gonadotropin, GtH)在鱼类繁殖中起着承上启下的关键作用,它调节生殖细胞的分化、成熟和排放,参与类固醇激素的生成调节,其中促滤泡激素(follicle-stimulating hormone, FSH),在鱼类称为促性腺激素 I(GtH I)^[1-4]。对高等动物的研究表明,促滤泡激素在体内的重要生理功能是由促滤泡激素受体(follicle-stimulating hormone receptor, FSHR)介导的,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^[5-7]。在硬骨鱼类中,FSHR 并非只与 FSH 特异性结合,在某些鱼类中,FSHR 也能与促黄体激素(luteinizing hormone, LH)结合,鱼类 FSHR 主要在性腺中表达,分布在卵母细胞膜细胞层和颗粒细胞层及雄鱼精子发生过程中的相关细胞中^[8-9]。

FSHR 是膜受体,属于 G 蛋白偶联受体(gprotein-coupledreor, GPCR)超家族,同促黄体

激素受体(LHR)和促甲状腺激素受体(TSHR)共同组成了糖蛋白激素受体(glycoprotein hormone receptor, GpHR)亚家族,这个家族的成员有一个典型的结构特征:很大的胞外区域(extracellular domain, ECD),由 7 个跨膜螺旋(transmembrane helix, TM helix)构成的锚定单元(anchoring unit),及 C-端的胞内尾巴,其中 ECD 是激素结合区域,7 个 TM helix 区具有信号转导和 G 蛋白偶联功能^[10-12]。鱼类 FSHR 的 ECD 区域同哺乳类的 ECD 区有很大的区别,其 ECD 区域占了整个受体分子的一半是糖蛋白激素配基的结合位点。胞外区域含有很多富含亮氨酸重复序列的片段(leucine-rich repeats, LRR),在庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*) FSHR 的 ECD 区有 10 个 LRR。LRRs 通常被认为介导蛋白之间的相互作用。在 GTHRS 的胞外域, LRRs 被认为是配基结合区。每个富含亮氨酸重复片段含有 20 ~

收稿日期:2010-04-03 修回日期:2010-07-15

资助项目:国家“十一五”科技支撑计划(2006BAD09A01)

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

29个氨基酸,包含XXLXLXX这个连续的序列,X可以是任何一个氨基酸,L是亮氨酸,缬氨酸或其他疏水性氨基酸^[13-16]。*FSHR* cDNA已经从一些硬骨鱼类的性腺中得到克隆,其中在玫瑰大麻哈鱼(*Oncorhynchus rhodurus*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)、日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)、舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)、庸鲽、黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)、大西洋鳕(*Gadus morhua*)、非洲鲇(*Clarias gariepinus*)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)等中进行了组织表达方面的研究^[2-4,17-22]。

以半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther)为研究对象,应用分子生物学方法,克隆*FSHR*的全长cDNA序列,对*FSHR* mRNA在不同组织的表达及在雌鱼不同发育期卵巢的表达进行研究,同时分析半滑舌鳎血浆E₂季节含量变化。该研究为进一步阐明*FSHR*的生理功能奠定基础,同时也为鱼类生殖调控与育种提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 实验样品

2007年3月至2008年2月,从烟台莱州某养殖场同一个池塘内每3个月采集一次,采样月份分别为4月、7月、10月、1月,共采集40尾,其中用于本实验的雌性半滑舌鳎16尾,2~3龄,体长43.5~54.2 cm,体重556.3~1 194.6 g,在实验室水族箱内暂养2~3 d,流水充氧,人工调节光照,自然水温。鱼尾静脉采集血液样品,分离血清(4℃储存4~6 h后,16 000 r/min离心10 min,取上清液),-40℃储存,用于激素测定。实验鱼解剖后迅速取出各组织,部分保存于Bouin氏液用于组织切片,部分保存于-80℃超低温冰箱用于基因克隆和表达。

1.2 试剂

本实验所用PCR简并引物和特异性引物均由上海生工生物技术公司合成。*Taq*酶、DNase I (RNasefree)、RNasin购自TaKaRa公司, RNA提取试剂Trizol Reagent为Invitrogen公司产品, M-MLV购自Promega公司, SMARTTM RACE cDNA扩增试剂盒、Advantage 2 PCR试剂盒购自Clontech公司, TIANgel Midi普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、Marker、pGM-T载体、DH5 α 感受态细胞购自北京天根生化科技有限公司,其

余均为国产分析纯试剂。

1.3 总RNA的提取和cDNA的合成

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

1.4 *FSHR*全长克隆

根据已知鱼类*FSHR*保守序列,利用CodeHop原理^[22]设计简并引物FSHRf1和FSHRf2(表1),以cDNA为模板,以上述简并引物进行扩增。根据简并引物扩增得到序列,利用Primer 5.0设计特异性引物FSHRF2(3'RACE)和FSHRR2(5'RACE)(表1)进行全长扩增。

1.5 *FSHR*全长序列分析

所得序列在NCBI数据库中进行BLAST比对和同源性比较,运用DNAMAN软件,将所得*FSHR*的cDNA序列转化为氨基酸序列,与已知物种的*FSHR*氨基酸进行序列分析,采用Neighbour-joining法(1 000 runs)结合Clustal X、MEGA4软件,进行多重比对、构建系统进化树。并利用TMHMM Server v. 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)来预测氨基酸结构的跨膜螺旋结构区域;经SignalP 3.01软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测信号肽;由NetPhosK 1.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>)预测protein kinase C (PKC)位点;用NetNGlyc 1.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)来预测N-linked glycosylation sites,利用NetPhos 2.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)来预测Ser, Thr和Thy磷酸化位点。

1.6 放射免疫测定(RIA)方法测定雌鱼血浆中雌二醇(E₂)含量

根据温海深等^[23]激素测定方法,采用¹²⁵I标记的放射免疫分析法(RIA)测定雌鱼血清中雌二醇(E₂)含量的季节变化。

1.7 *FSHR*的组织表达和在半滑舌鳎卵巢中的周年表达

各组织cDNA稀释后取1 μ L作为模板进行PCR扩增。利用Primer 5.0软件设计一对PCR特异性引物FSHRF3和FSHRR3(引物见表2)。PCR反应条件:94℃预变性5 min,94℃ 35 s,60.3℃

35 s, 72 °C 35 s 共 34 个循环, 72 °C 10 min。18S rRNA 作为反应的内参照物, 引物序列来自孙业盈等^[24] (引物见表 2)。18S rRNA 所进行的 PCR 反应条件为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 35 s, 61 °C 35 s, 72 °C 35 s 共 26 个循环, 72 °C 10 min。取 8 μL 的 PCR 产物进行电泳。对电泳结果采用 Tanon GIS 凝胶图象处理系统进行分析。根据实验鱼性腺发育程度并考虑统计分析的需要, 选择合适的各月份所用鱼重复数, 实验所得数据采用 SPSS 13.0 统计软件中的 Duncan 氏法进行数据处理和检验分析, 当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。用 EXCEL 表格生成柱状图, 所用数据均表示为平均数 \pm 标准误 (mean \pm SE)。

2 结果

2.1 半滑舌鲷 *FSHR* 全长克隆

利用简并引物 FSHRF1 和 FSHRR1 (表 1), 通过 RT-PCR 扩增出 883 bp 长度的片段。在此序列的基础上, 利用 PRIMER 5.0 设计 3'RACE 扩增引物 FSHRF2 和 5'RACE 扩增引物 FSHRR2 (表 2), 分别扩出 *FSHR* 的 3'端序列和 5'端序列。最后, 综合分析得 *FSHR* cDNA 全长序列, 此序列长度为 3 105 bp。经 BLAST 比对, 获得的序列与其他鱼类的 *FSHR* 基因有较高的同源性 (表 2), 表明这一序列属于 *FSHR* 家族, 该序列提交 Genbank 的注册号为 Eu661784。

表 1 半滑舌鲷 *FSHR* 克隆和表达分析所用的引物

Tab. 1 Primers used for *Cynoglossus semilaevis FSHR* cloning and mRNA expression analysis

引物名称 primer symbol	引物序列 (5'-3') primer sequence (5'-3')	扩增序列长度 (bp) length of sequence
FSHRF1	CCTGACCTACCCCTCCcaytgytgygc	883
FSHRR1	GGCGAAGAAGGAGATGgngccatrea	
FSHRF2 (3'RACE)	GCGCATGGCCATCCTCATCTTCACCGACT	1 103
FSHRR2 (5'RACE)	GGTCAGCAAAGGCCAAGTGGCACAT	1 512
FSHRF3	CACACCATCACGTATGCTCTG	264
FSHRR3	GACAGTCAGATAGATGCTGA	
18sF	CCTGAGAAACGGCTACCACATC	119
18sR	CCAATTACAGGGCCTCGAAAG	

表 2 *FSHR* 核苷酸序列在 GenBank 上同源性比较结果

Tab. 2 Homologous comparison of the fragment of *FSHR* nucleotide

GenBank 登录号 accession number	物种 species	分值 score (bits)	期望值 E value	同源性 (%) identities
AY642113	舌齿鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	1 572	0.0	81
EU502847	庸鲷 <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	1 496	0.0	82
AB041762	尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	1 317	0.0	80
DQ522160	平鲷 <i>Rhabdosargus sarba</i>	1 295	0.0	79
AY587262	金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	1 284	0.0	79
GQ258853	牙汉鱼 <i>Odontesthes bonariensis</i>	1 123	0.0	78
AB295490	底鳉 <i>Fundulus heteroclitus</i>	1 099	0.0	78

2.2 半滑舌鲷 *FSHR* 全长序列分析

半滑舌鲷 cDNA 全长 3 105 bp, 共编码 704 个氨基酸。该氨基酸序列分为 382AA 的胞外区域 (ECD), 其中含有长为 29AA 的信号肽; 长度为 263AA 的 7 次跨膜螺旋区 (7 TM helices) 及胞内区 (59AA)。在 TM I - VII 区域内, 通过 3 个胞内环 (IL1 - IL3) 和 3 个胞外环 (EL1 - EL3) 来连接 7 个跨膜序列。据软件推测整个编码区共有 19 个 Ser, 4 个 Thr 和 5 个 Tyr 磷酸化位点。其中在

ECD 区域有 11 个 Ser 磷酸化位点 (²⁹S, ⁶⁶S, ⁸³S, ⁸⁶S, ¹⁷⁰S, ²⁷²S, ²⁹⁴S, ³³²S, ³³⁶S, ³⁵⁷S, ³⁶³S); 3 个 Thr 磷酸化位点 (⁷T, ¹⁰⁴T, ²¹⁷T) 和 4 个 Thy 磷酸化位点 (⁶⁹Y, ¹⁶⁸Y, ²⁹⁶Y, ³¹⁷Y)。在第二个胞内环 (IL2) 内有 4 个 Ser 磷酸化位点 (⁵²⁵S, ⁵²⁶S, ⁵²⁸S, ⁵⁴⁰S) 和 1 个 Thy 磷酸化位点 (⁵⁴⁶T); 在胞内区含有 4 个 Ser 磷酸化位点 (⁶⁷⁴S, ⁶⁷⁶S, ⁶⁸⁴S, ⁶⁸⁸S) 和 1 个 Thr 位点 (648Y)。据推测, 该基因含有 3 个潜在的 N 基端糖基化位点, 分别是 ⁶²NISS, ²²⁶NGIK 和 ³⁵⁶NSTS。

另外据推测, ⁴⁴¹T 为潜在的 PKC 位点(图 1)。

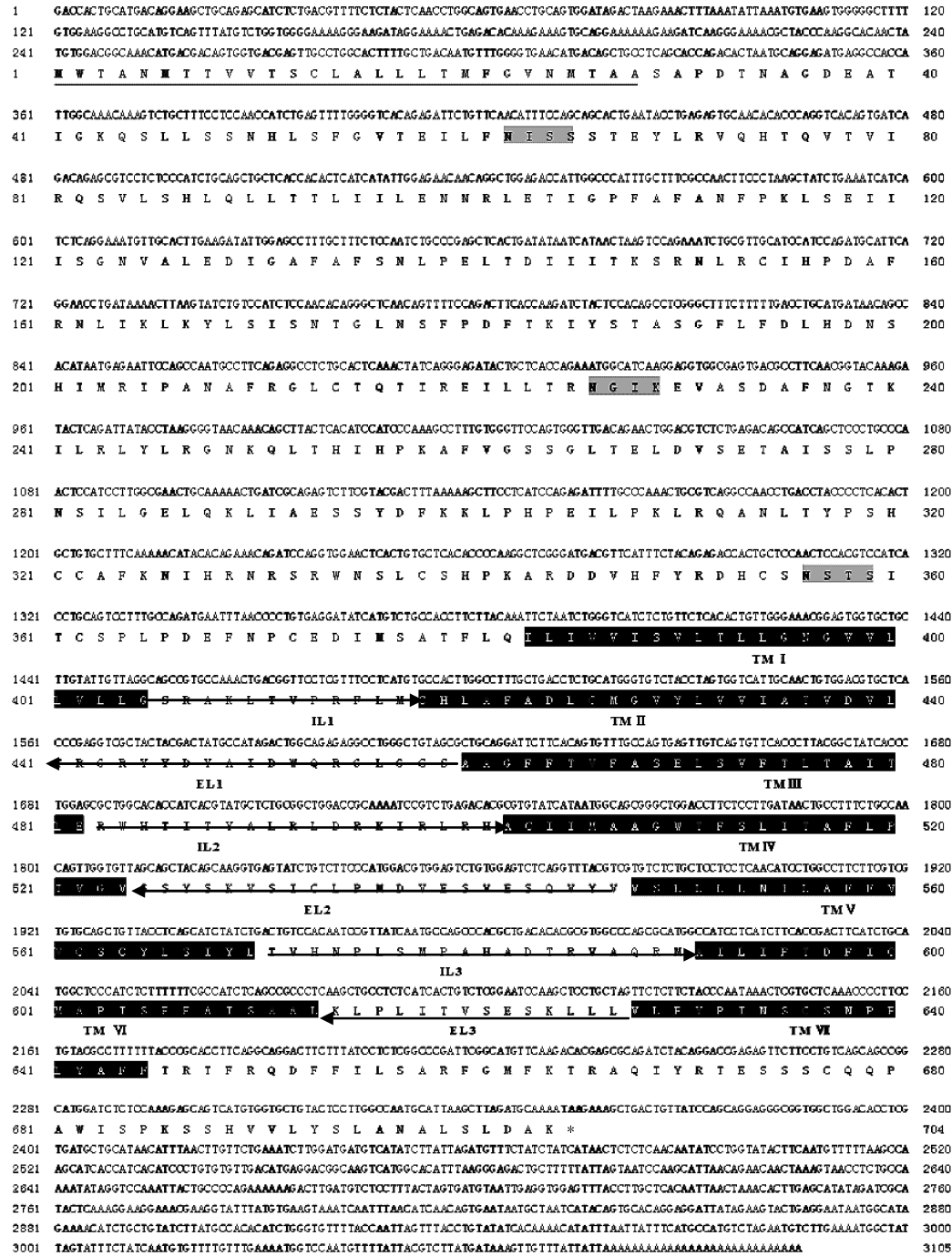


图 1 半滑舌鲷 *FSHR* cDNA 全长序列

信号肽: M W T A N M, 跨膜螺旋区: [vertical bars], 终止密码子: *, 胞内环: →, 胞外环: ←, 潜在的 N 基端糖基化位点: [N I S S]。

Fig. 1 Full sequence of *FSHR* of *C. semilaevis*

signal protein: M W T A N M, transmembrane helices: [vertical bars], termination codon: *, intracellular loops(IL1-3): →, extracellular loops(EL1-3): ←, potential N-linked glycosylation sites(conserved in the Hfshr): [N I S S]。

2.3 半滑舌鲷 *FSHR* 氨基酸序列比对和系统发生分析

利用 Clustal X 进行半滑舌鲷 *FSHR* 和其他

物种的 *FSHR* 氨基酸序列进行比对, 发现了 GpHR 家族的特殊信号序列, 如⁸² CCAF, ⁴⁸¹ ERW, ⁵⁹⁴ FTD 和⁶⁶⁷ NPFLY, 这些序列高度保守,

另外³²⁰CC 和³⁷¹C 处是富含 Cys 残基的高度保守区。通过与庸鲽,人等进行氨基酸比对,预测半滑舌鲷 FSHR 含有 10 个 LRRs(LRR1-10)。另外,

氨基酸比对结果显示, TM I - VII 都位于保守性较高的区域(图 2)。

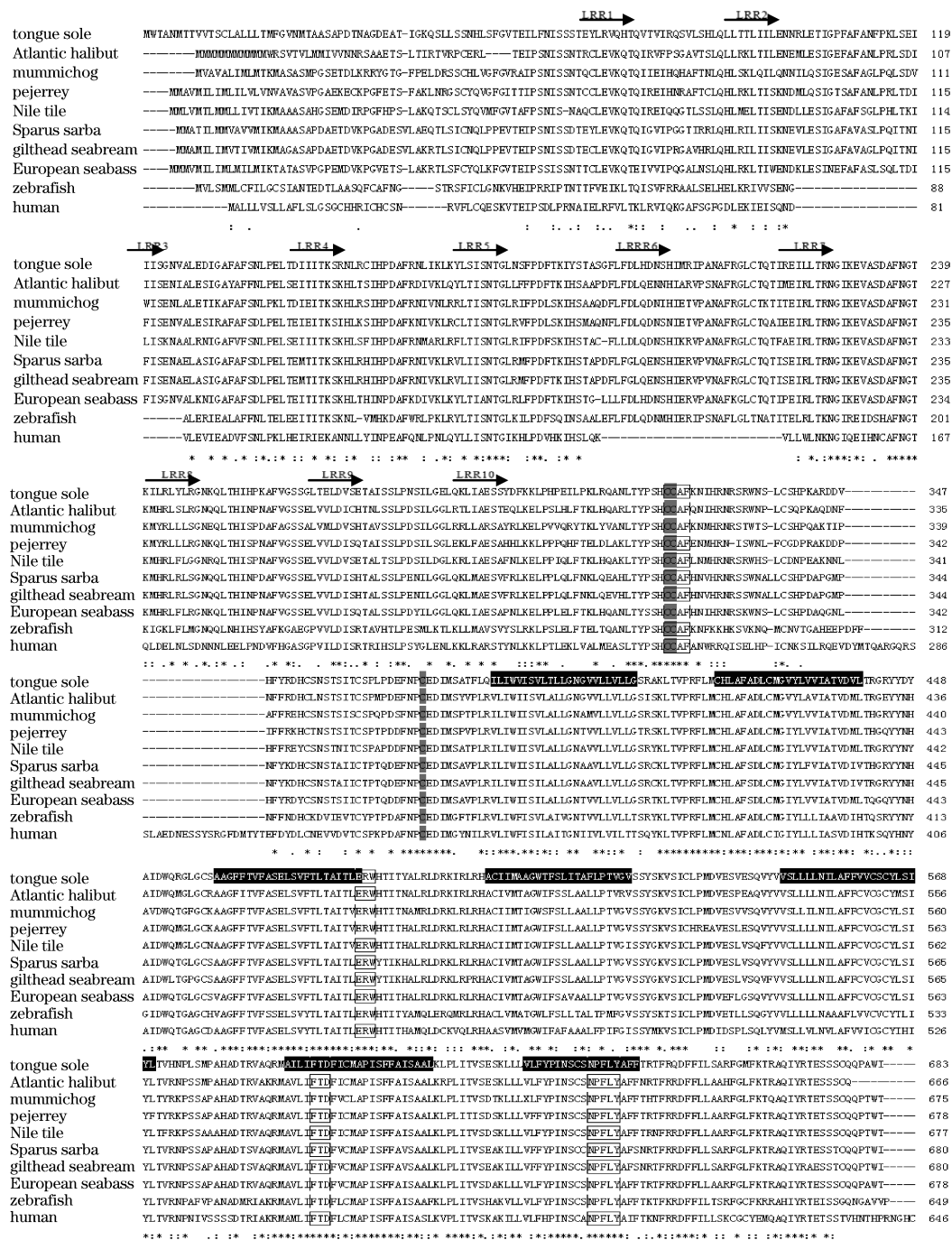


图 2 半滑舌鲷 FSHR 与其它物种 FSHR 氨基酸序列比对

LRR1-10:富含亮氨酸重复区域,黑底白字;7 次跨膜螺旋区,灰底黑字;富含 Cys 残基的高度保守区, [CCAF]、[ERW]、[FTD]、[NPFLY]:GpHR 家族的特殊保守信号序列。

Fig. 2 Alignment of FSHR from several species

LRR1-10:leucine-rich repeats,black backgrounds and white words;seven transmembrane helix domains,gray backgrounds and black words; high conserved domains rich in Cys residues, [CCAF], [ERW], [FTD], [NPFLY];special conserved signal sequence of GpHR family.

利用半滑舌鳎和其它物种的 FSHR 氨基酸序列(各种动物 FSHR 蛋白质 GenBank 登录号见表 2),采用 MEGA 4 构建系统进化树(图 3)。结果显示,整个进化树分为两大枝,即各种鱼类聚为的

一枝,及哺乳类、两栖类和鸟类形成的一枝。其中半滑舌鳎处于鱼类这一分枝,且与庸鲽和牙鲆合为一个小的分枝,亲缘关系最近。

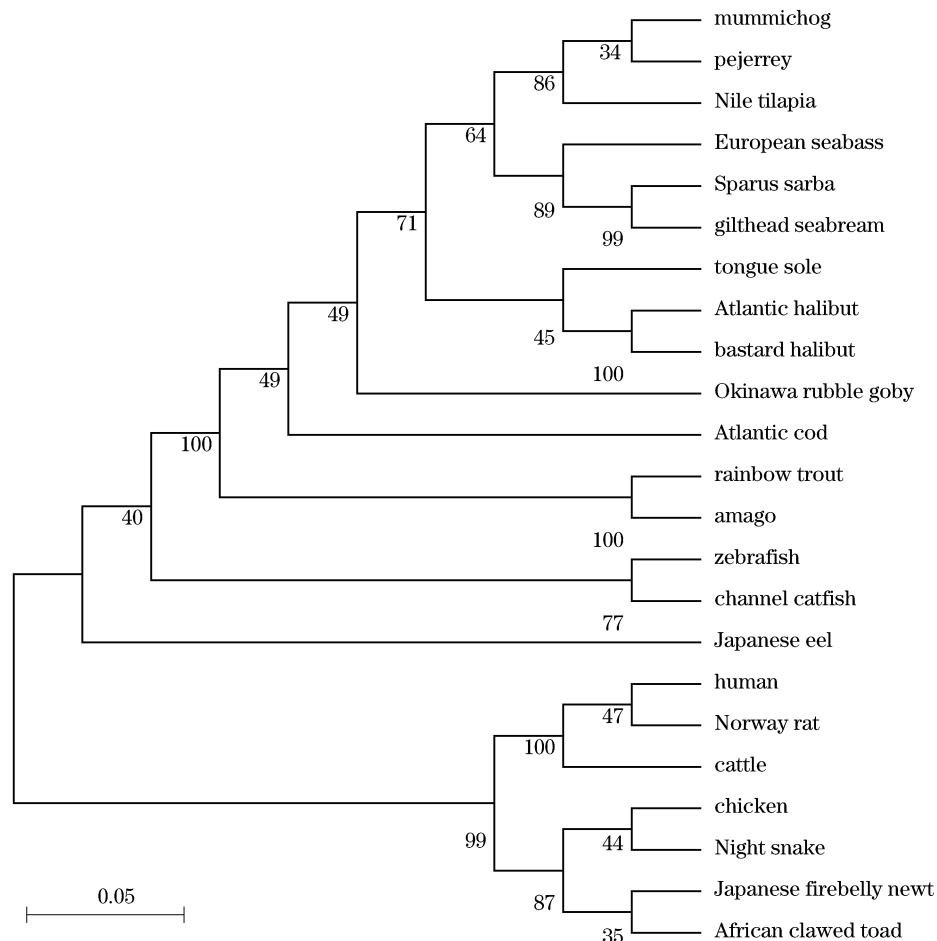


图 3 23 种物种 FSHR 氨基酸序列构建的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree for 23 kinds of animals' FSHR amino acid sequences

GenBank accession numbers of FSHR:底鳉 mummichog (*Fundulus heteroclitus*) BAF48336.1; 牙汉鱼 pejerrey (*Odontesthes bonariensi*) ACU28776.1; 尼罗罗非鱼 Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) BAB16106.1; 舌齿鲈 European seabass (*Dicentrarchus labrax*) AAV48628.1; 平鲷 Sparus sarba (*Rhabdosargus sarba*) ABI93201.1; 金头鲷 gilthead seabream (*Sparus aurata*) AAT01413.1; 半滑舌鳎 tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) ACD39387.2; 庸鲽 Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) ACB13178.1; 牙鲆 bastard halibut (*Paralichthys olivaceus*) BAF69018.1; 黄点拟矶塘鳢 Okinawa rubble goby (*Paralichthys olivaceus*) BAF69018.1; 大西洋鳕 Atlantic cod (*Gadus morhua*) ABD62885.1; 虹鳟 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) NP_001117799.1; 玫瑰大麻哈鱼 amago (*Oncorhynchus rhodurus*) BAA86898.1; 斑马鱼 zebrafish (*Danio rerio*) AAP33512.1; 斑点叉尾鲷 channel catfish (*Ictalurus punctatus*) AAK16067.1; 日本鳗鲡 Japanese eel (*Anguilla japonica*) BAF79914.1; 人 human (*Homo sapiens*) AAI25271.1; 褐家鼠 Norway rat (*Rattus norvegicus*) NP_954707.1; 牛 Cattle (*Bos taurus*) NP_776486.1; 鸡 chicken (*Gallus gallus*) AAC60030.1; 夜沙蛇 night snake (*Hypsiglena ochrorhyncha*) ACS35047.1; 日本赤腹蝾螈 Japanese firebelly newt (*Cynops pyrrhogaster*) BAB13501.1; 非洲爪蟾 African clawed toad (*Xenopus laevis*) CAB62285.1.

2.4 雌鱼血清中雌二醇 (E_2) 含量的年周期变化

雌性半滑舌鳎血浆中 E_2 含量随着性腺的发育表现出规律的季节变化, E_2 含量在整个发育周

期中的 4 月份时含量最低, 均值是 24.31 pg/mL ($n=4$); 随后逐渐上升, 7 月份平均值是 57.07 pg/mL ($n=3$); 在 10 月时 E_2 含量达到最高峰, 均

值为 184.06 pg/mL ($n=4$); 然后开始下降, 到达 1 月份时含量均值为 68.72 pg/mL ($n=3$) (图 4)。

2.5 *FSHR* 在半滑舌鲷的组织表达

采用 RT-PCR 法, 检测 *FSHR* 在半滑舌鲷的卵巢、精巢、肝脏、胃、肠、鳃、心、脾、肾、头肾、脑和肌肉 12 种组织中的表达。结果显示, *FSHR* 在半滑舌鲷各组织中分布广泛, 尤其以脾、肾、头肾中表达最为强烈, 卵巢、精巢次之 (图 5)。

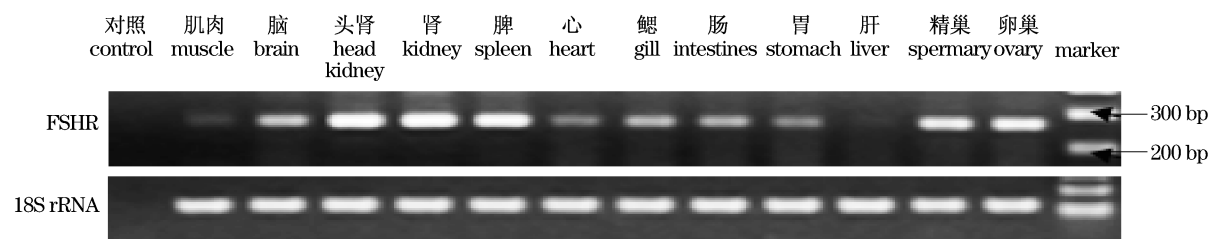


图 5 半滑舌鲷 *FSHR* 在组织中的表达

Fig. 5 Tissue distribution of *FSHR* in *C. semilaervis* by RT-PCR

2.6 *FSHR* 基因在雌性半滑舌鲷不同发育阶段卵巢中的表达

卵巢中, *FSHR* mRNA 在 1 月份 (VI 期) 时表达量最低, 相对表达量 (*FSHR*/*18S*) 的平均值为 0.477 4 ($n=3$), 4 月份 (II 期) 时表达量有所增加, 相对表达量的平均值为 0.743 2 ($n=4$), 到达 7 月 (III 期) 时, 表达量持续增强, 相对表达量的平均值为 0.803 8 ($n=5$), 到 10 月份 (IV 期、V 期) 时, 表达量显著性的提升, 达到最高值, 相对表达量的平均值为 0.955 4 ($n=4$) (图 6)。

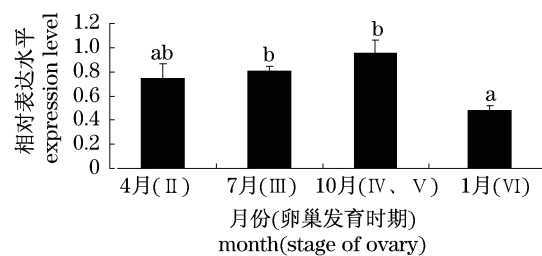


图 6 半滑舌鲷 *FSHR* mRNA 在雌鱼卵巢的周年表达变化
Fig. 6 Seasonal change of *FSHR* mRNA expression level in ovary of female *C. semilaervis*

3 讨论

半滑舌鲷 cDNA 全长为 3 105 bp, 该基因核苷酸序列与庸鲽 *FSHR* 同源性最高 (82%), 且氨基酸序列含有 GHR 家族典型的 7 次跨膜螺旋结

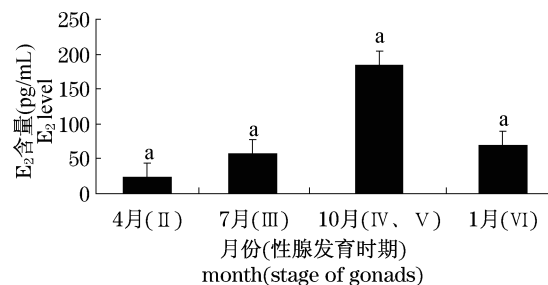


图 4 雌性半滑舌鲷血浆中 E_2 含量年周期变化

Fig. 4 Plasma 17 β -Estradiol level in female *C. semilaervis*

构 (7 TM helices), 在进化分析中位于鱼类 *FSHR* 分支, 这些都充分证明所得序列为目的基因。

采用 RT-PCR 方法检测 *FSHR* mRNA 在半滑舌鲷中的组织表达, 结果发现, 与玫瑰大麻哈鱼一样^[2,17], 半滑舌鲷 *FSHR* mRNA 在卵巢和精巢中高度表达。除此之外, *FSHR* mRNA 也在胃、肠、鳃、心、脾、肾、头肾、脑和肌肉中具有较高的表达量, 这与 Kumar 等^[25] 在斑点叉尾鲷的脾中检测到 *FSHR*, Kwok 等^[18] 在斑马鱼头肾中检测到 *FSHR* 表达, Maugars 等^[19] 在大西洋鲑的鳃中也检测到 *FSHR* 表达, Kobayash 等^[26] 在庸鲽的脑、垂体和头肾中检测到 *FSHR*, 均与本研究结果相似。目前关于 *FSHR* 在非性腺组织中广泛表达的生理机制还不是很清楚, 本研究结果暗示半滑舌鲷 FSH 和 LH 可能具有更加广泛的性腺外生理功能。

FSHR mRNA 表达水平, 在半滑舌鲷卵黄发生前 (4 月, II 期) 表达量较低, 卵黄发生开始 (7 月, III 期) 时, 表达量开始上升; 在卵黄发生后期及卵黄发生后 (10 月份, IV 期和 V 期), 表达量迅速增加, 达到峰值; 卵巢闭锁或退化吸收 (1 月, VI 期) 时, 表达量显著下降。与舌齿鲈卵巢中 *FSHR* 在繁殖周期中的表达变化趋势相似^[27]。多次产卵型的斑马鱼、尼罗罗非鱼和庸鲽研究报道也与半滑舌鲷结果类似, *FSHR* 表达量都是在卵黄发生早期开始增加, 并在整个卵黄发生过程中

都在变多,最后在卵黄发生后期时达到最大值^[24-25,28]。虹鳟卵巢中的研究表明,FSHR 的含量上升与卵细胞的成熟能力和排卵有关^[29-30]。在上述鱼类中,FSHR 的表达水平随卵母细胞内卵黄发生的进行而变化,说明 FSHR mRNA 表达与卵黄蛋白积累密切相关。

研究结果表明,半滑舌鳎卵巢中 FSHR mRNA 表达与血清中 E₂ 含量年季节变化一致,说明 FSHR 的表达受 E₂ 的反馈作用。对其它鱼类研究发现, E₂ 参与鱼类 GtHs 的调控和释放,对 GtHs 有正反馈作用^[31-35]。黑鲷中两种促性腺激素受体的表达量在注射了 E₂ 后显著升高,并且与 GtH mRNA 变化趋势一致,可能是因为 E₂ 刺激脑中的 GnRH 的增加,进而导致脑垂体 GtHs 的释放^[36],而 GtHs 则通过与受体结合来促进性腺的发育^[37],这说明 E₂ 参与卵巢的发育过程。

本研究首次克隆了半滑舌鳎 FSHR 全长 cDNA 序列,进行了组织及在卵巢生殖周期中的表达分析,初步查明了 FSHR 在半滑舌鳎繁殖周期中的作用,为进一步揭示 FSHR 生理功能奠定基础,同时也为阐明鱼类生殖调控机制提供科学依据。

参考文献:

- [1] Schulz R W, Vischer H F, Cavaco J E B, *et al.* Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2001, 129(2-3):407-417.
- [2] Rocha A, Gómez A, Zanuy S, *et al.* Molecular characterization of two sea bass gonadotropin receptors: cDNA cloning, expression analysis, and functional activity [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2007, 272(1-2):63-76.
- [3] Kobayashi T, Andersen Ø. The gonadotropin receptors FSH-R and LH-R of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), 1: Isolation of multiple transcripts encoding full-length and truncated variants of FSH-R [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 156(3):584-594.
- [4] Mittelholzer C, Andersson E, Taranger G L, *et al.* Molecular characterization and quantification of the gonadotropin receptors FSH-R and LH-R from Atlantic cod (*Gadus morhua*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 160(1):47-58.
- [5] Themmen A P N, Huhtaniemi I T. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function [J]. *Endocr Rev*, 2000, 21(5):551-583.
- [6] Ascoli M, Fanelli F, Segaloff D L. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective [J]. *Endocr Rev*, 2002, 23(2):141-174.
- [7] Vassart G, Pardo L, Costagliola S. A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors [J]. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29(3):119-126.
- [8] Yan L, Swanson P, Dickhoff W W. A two-receptor model for salmon gonadotropins (GtH I and GtH II) [J]. *Biol Reprod*, 1992, 47(3):418-427.
- [9] Miwa S, Yan L, Swanson P. Localization of two gonadotropin receptors in the salmon gonad by *in vitro* ligand autoradiography [J]. *Biol Reprod*, 1994, 50(3):629-642.
- [10] Oba Y, Hirai T, Yoshiura Y, *et al.* Fish gonadotropin and thyrotropin receptors: the evolution of glycoprotein hormone receptors in vertebrates [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2001, 129(2-3):441-448.
- [11] Kumar R S, Trant J M. Piscine glycoprotein hormone (gonadotropin and/thyrotropin) receptors: a review of recent developments [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2001, 129(2-3):347-355.
- [12] Jeng S R, Yueh W S, Chen G R, *et al.* Differential expression and regulation of gonadotropins and their receptors in the Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2007, 154(1-3):161-173.
- [13] Kajava A V, Vassart G, Wodak S J. Modeling of the three-dimensional structure of proteins with the typical leucine-rich repeats [J]. *Structure*, 1995, 3(9):867-877.
- [14] Kobe B, Kajava A V. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, 11(6):725-732.
- [15] Smits G, Campillo M, Govaerts C, *et al.* Glycoprotein hormone receptors: determinants in leucine-rich repeats responsible for ligand specificity [J]. *EMBO J*, 2003, 22(11):2692-2703.
- [16] Levavi-Sivan B, Bogerd J, Mañanós E L, *et al.* Perspectives on fish gonadotropins and their receptors [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(3):412-437.
- [17] Oba Y, Hirai T, Yoshiura Y, *et al.* Cloning,

- functional characterization, and expression of a gonadotropin receptor cDNA in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999, 263(2):584-590.
- [18] Kwok H F, So W K, Wang Y, *et al.* Zebrafish gonadotropins and their receptors; I. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors-evidence for their distinct functions in follicle development[J]. Biology of Reproduction, 2005, 72(6):1370-1381.
- [19] Maugars G, Schmitz M. Molecular cloning and characterization of FSH and LH receptors in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. General and Comparative Endocrinology, 2006, 149(1):108-117.
- [20] An K W, Lee K Y, Yun S G, *et al.* Molecular characterization of gonadotropin subunits and gonadotropin receptors in black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*; Effects of estradiol-17 β on mRNA expression profiles[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 2009, 152(2):177-188.
- [21] Bogerd J, Blomenrohr M, Andersson E, *et al.* Discrepancy between molecular structure and ligand selectivity of a testicular follicle-stimulating hormone receptor of the African catfish (*Clarias gariepinus*) [J]. Biol Reprod, 2001, 64(6):1633-1643.
- [22] 陈彩芳, 温海深, 何峰, 等. 程序化设计的简并引物克隆半滑舌鳎 *CYP17* 基因 [J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(6):1213-1218.
- [23] 温海深, 宋海霞, 杨立廷, 等. 外源激素对养殖牙鲆血浆睾酮和雌二醇含量的影响研究 [J]. 海洋学报, 2006, 28(4):115-120.
- [24] 孙业盈, 张全启, 齐洁, 等. 半滑舌鳎 *DMRT1* 基因的克隆与表达分析 [J]. 武汉大学学报:理学版, 2008, 54(2):221-226.
- [25] Kumar R S, Ijiri S, Trant J M. Molecular biology of the channel catfish gonadotropin receptors: 2. Complementary DNA cloning, functional expression, and seasonal gene expression of the follicle-stimulating hormone receptor [J]. Biol Reprod, 2001, 65(3):710-717.
- [26] Kobayashi T, Pakarinen P, Torgersen J, *et al.* The gonadotropin receptors FSH-R and LH-R of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)—2. Differential follicle expression and asynchronous oogenesis [J]. General and Comparative Endocrinology, 2008, 156(3):595-602.
- [27] Rocha A, Zanuy S, Carrillo M, *et al.* Seasonal changes in gonadal expression of gonadotropin receptors, steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenic enzymes in the European sea bass [J]. General and Comparative Endocrinology, 2009, 162(3):265-275.
- [28] Hirai T, Oba Y, Nagahama Y. Fish gonadotropin receptors: molecular characterization and expression during gametogenesis [J]. Fisheries Sci, 2002, 68 (Suppl.):675-678.
- [29] Bobe J, Nguyen T, Jalabert B. Targeted gene expression profiling in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary during maturational competence acquisition and oocyte maturation [J]. Biol Reprod, 2004, 71(1):73-82.
- [30] Sambroni E, Le Gac F, Breton B, *et al.* Functional specificity of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gonadotropin receptors as assayed in a mammalian cell line [J]. Endocrinol, 2007, 195:213-228.
- [31] Trudeau V L, Peter R E, Sloley B D. Testosterone and estradiol potentiate the serum gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in goldfish [J]. Biol Reprod, 1991, 44(6):951-960.
- [32] Yen F P, Lee Y H, He C L, *et al.* Estradiol-17 β triggers luteinizing hormone release in the protandrous black porgy (*Acanthopagrus schlegeli* Bleeker) through multiple interactions with gonadotropin-releasing hormone control [J]. Biol Reprod, 2002, 66(1):251-257.
- [33] Huggard-Nelson D L, Nathwani P S, Kermouni A, *et al.* Molecular characterization of LH- β and FSH- β subunits and their regulation by estrogen in the goldfish pituitary [J]. Mol Cell Endocrinol, 2002, 188(1-2):171-193.
- [34] Lee Y H, Wu G C, Du J L, *et al.* Estradiol-17 β induced a reversible sex change in the fingerlings of protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* Bleeker; the possible roles of luteinizing hormone in sex change [J]. Biol Reprod, 2004, 71(4):1270-1278.
- [35] Aroua S, Weltzien F A, Le Belle N, *et al.* Development of real-time RT-PCR assays for eel gonadotropins and their application to the comparison of *in vivo* and *in vitro* effects of sex steroids [J]. Gen Comp Endocrinol, 2007, 153(1-3):333-343.
- [36] Adams T E, Norman R L, Spies H G, *et al.* Gonadotropin-releasing hormone receptor binding and pituitary responsiveness in estradiol-primed monkeys [J]. Science, 1981, 213:1388-1390.

[37] Nagahama Y, Yoshikuni M, Yamashita M, *et al.*
Regulation of oocyte growth and maturation in fish

[J]. *Curr Top Dev Biol*, 1995, 30: 103–145.

Cloning of *FSHR* and expression analysis during the reproductive cycle in female *Cynoglossus semilaevis* Günther

CHEN Xiao-yan, WEN Hai-shen*, HE Feng, LI Ji-fang, CHEN Cai-fang,
ZHANG Jia-ren, JIN Guo-xiong, SHI Bao, SHI Dan, YANG Yan-ping

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

Abstract: The complete cDNA sequence of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene was cloned by degenerate primer PCR amplification and RACE cDNA amplification for the first time. The length of the cDNA is 3105 bp, and it encodes a protein of about 704 amino acids, which contains the conserved seven transmembrane helix domains (TM helix), and it belongs to glycoprotein hormone receptor (GHR) family. Phosphorylation site predictions identified 19 Ser, 4 Thr and 5 Tyr potential phosphorylation sites in tongue sole, and only one protein kinase C phosphorylation site (⁴⁴¹T) was predicted. The Clustal X alignment also revealed the presence of specific signature sequences (e. g. ⁸²CCAF, ⁴⁸¹ERW, ⁵⁹⁴FTD and ⁶⁶⁷NPFLY), which are highly conserved in GpHRs. And comparison with the halibut FSH-R also allowed the identification of 10 imperfect LRRs in the FSHR of *Cynoglossus semilaevis*. Tissue expression analysis showed that *FSHR* mRNA is expressed widely in *C. semilaevis*. Except the high levels in gonads, strong amplification signals were also detected in extragonadal tissues including the spleen, kidney and head kidney. Plasma 17 β -Estradiol (E₂) seasonal changes are detected by radio immunoassay (RIA). The result shows that the lowest level appears in April and the highest peak of a year is in October. And we analyzed the relative expression level of *FSHR* in reproductive cycle of female. There is the highest level in October and the lowest level in January.

Key words: *Cynoglossus semilaevis* Günther; follicle-stimulating hormone receptor (FSHR); gene clone; mRNA expression; 17 β -Estradiol

Corresponding author: WEN Hai-shen. E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn