

团头鲂糖皮质激素受体基因组织表达分布及其在应激中的表达变化

陈凯^{1,2}, 刁丙文^{1,3}, 滕涛⁴, 秦婷¹, 潘良坤¹, 谢骏^{1*}

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,
农业农村部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;
3. 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 湖北 武汉 430070;
4. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081)

摘要: 为了解团头鲂糖皮质激素受体(GR)在应激反应中的调控机制, 本研究以皮质醇注射模拟应激事件, 采集组织样品, 常规检测血糖、血清皮质醇水平; 利用荧光定量PCR检测了 gr 在不同组织中的表达丰度及其参与调控的功能基因的表达变化; 并通过常规石蜡切片开展了组织病理学研究。结果显示, $gr1$ 在脾脏、鳃、头肾等组织中有较高的表达量, $gr2$ 则在肝、垂体、肠等组织中具有较高的表达丰度。应激恢复过程中, 下丘脑 $gr1$ 表达量存在波动, $gr2$ 在0 h表达显著上调, $gr1/gr2$ 值逐渐增大; 垂体中 $gr1$ 和 $gr2$ 均呈现先升后降的趋势, $gr1/gr2$ 值在2 h达到峰值水平; 头肾中 $gr1$ 表达量有波动, 而 $gr2$ 在0 h和2 h的表达量显著低于其他检测点的表达量, $gr1/gr2$ 值逐渐减小; 肝脏中 $gr1$ 的表达量在0 h和2 h的表达量显著高于其他检测点, $gr2$ 表达有上下波动的现象, $gr1/gr2$ 值有减小的趋势, 而 $pepck$ 表达则出现了显著上调, 在2 h达到峰值; 皮肤中 $gr1$ 先升高后降低, $gr2$ 在0 h和2 h的表达量显著低于其他检测点, $gr1/gr2$ 值在2~8 h维持在较大值, 而 occ 表达呈现先增加后降低的变化趋势; 鳃中 $gr1$ 与 $gr2$ 均在2 h时发生了显著上调, $gr1/gr2$ 值在2~8 h维持在较大值, occ 表达峰值出现在2 h。组织学研究显示鳃丝有增生现象, 肾间组织中类淋巴细胞增多, 其他所检视组织无明显病理改变。应激反应过程中 gr 在不同组织不同亚型间存在不同的表达变化, 以及和不同组织器官中相关功能基因的相关性显示了GR在相关调控中的复杂性, 而组织学研究结果则表明了应激反应存在诱发病理变化的风险。

关键词: 团头鲂; 糖皮质激素受体; 应激; 皮质醇; 闭合蛋白

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

水产养殖过程中, 鱼类常常遭遇不良环境和病原生物等应激因子干扰, 而机体在交感—嗜铬组织系统(sympathetico-chromafin system)以及下丘脑—垂体—肾间组织轴(hypothalamic-pituitary-interrenal axis, HPI axis)系统的调节下最终表现出以儿茶酚胺类激素和类固醇类激素(鱼类中以

皮质醇为主, 其属于类固醇类激素中的糖皮质激素glucocorticoid, GC)浓度升高为主要特征的应激反应; 由于血浆皮质醇含量的持续升高对鱼类的生长^[1]、繁殖^[2-3]与免疫机能^[4]等多方面有重要影响, 因此涉及皮质醇合成调控的HPI轴在应激相关研究中备受重视^[5]。生理学家Selye曾指

收稿日期: 2018-04-05 修回日期: 2018-07-06

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-45); 国家自然科学基金(31572662)

通信作者: 谢骏, E-mail: xiej@ffrc.cn

出应激反应属于生命活动过程中必然存在的现象,是动物机体对体内外各种有害刺激产生的全身性适应综合症^[2]。这种适应也由HPI轴参与调控^[5],最终落实到皮质醇与其受体——糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)介导的具体功能上。GR是保守的核受体超家族中的一员,属于核转录因子,与配体(如皮质醇)形成复合物后入核,进而与糖皮质激素反应元件(glucocorticoid response element, GRE)结合,从而调控相应基因的表达,发挥其生理功能^[6]。曾灵等^[7]利用生物信息学手段发现人类基因组数据库中含有GRE保守序列的基因,涉及糖代谢、生物氧化、细胞周期、信号转导、激素代谢、生长发育、应激响应、免疫、细胞骨架和脂质代谢诸多方面,这一结果与GC参与机体的能量代谢^[8]、炎症反应^[9-10]、免疫^[8, 11-12]等广泛生理活动的研究结论一致。

在脊椎动物亚门中,鱼类进化地位较为低等,但其在应激反应中由皮质醇含量升高带来的一系列生理功能变化,同样与GR介导的基因调控相关^[13]。现有研究表明应激事件会造成鱼类对寄生虫的抵抗力下降^[14],增强机体对病原菌^[4]和病毒^[15]的易感性,弱化机体的免疫屏障^[16-17]。这些情况的出现和GC经由GR介导出现的免疫相关基因的表达变化^[14]、相关免疫细胞功能抑制^[18]、白细胞吞噬功能损伤^[19]以及诱发白细胞凋亡致使外周白细胞数量减少^[14]密切相关。此外,还有研究显示鱼类GR参与鱼类能量代谢^[20]和渗透压^[20-21]调控,和应激事件中肠细胞旁通透性(intestinal paracellular permeability)增加以及紧密连接结构变化引起的屏障功能减弱也有关联^[20-21]。由此可见,GR系统对应激事件所涉及的鱼类健康具有重要意义。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)是国内主要淡水养殖鱼类之一,目前高密度养殖模式下病害频发,应激现象突出,而在斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)^[4]、黑鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[18]、金头鲷(*Sparus aurata*)^[19]和鲤(*Cyprinus carpio*)^[22]等鱼类中均已显示应激反应会影响机体免疫机能。故本研究以团头鲂为对象,在前期研究的基础上,采用外源性皮质醇注射的方式模拟应激事件,对应激恢复过程中肝脏、皮肤、鳃以及HPI应激调控轴上 gr 基因的表达变化进行监测,辅以肝脏中磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate

carboxykinase, PEPCK)、皮肤和鳃中闭合蛋白(occludin, OCC)等基因表达的监测以及组织学研究,进而探究团头鲂应激反应经由GR系统对其健康的影响。

1 材料与方法

1.1 实验对象

本实验所用团头鲂均由中国水产科学研究院淡水渔业研究中心南泉基地提供,鱼体健康无伤,体质量(445±32)g,体长(32±4)cm(n=150)。实验前,团头鲂于循环养殖系统中暂养2周,水温(25±1)°C,持续充氧,光周期同自然光,使用商品化颗粒饲料饲喂,日投饵量按体质量的3%计算,1天3次。

1.2 组织分布

基因组织表达分布研究所需组织样品来自随机选取的10尾团头鲂。实验鱼经MS-222(175 mg/L)麻醉后,取心脏、肝脏、脾脏、鳃、肾脏、头肾、下丘脑、垂体、皮肤、肌肉、肠、精巢与卵巢13种组织各0.1g左右,加入1 mL RNAiso Plus (TaKaRa, 大连宝生物工程有限公司)随即转入-80 °C保存备用。

1.3 应激模拟实验

选取140尾团头鲂,随机分为实验处理组和对照组,每组设置2个平行。经2周适应后开始实验。实验组腹腔注射浓度为10 mg/mL(溶剂为酒精)的皮质醇溶液(1 mL/kg体质量,皮质醇购自山东西亚化工有限公司),对照组注射等量的酒精溶剂,在注射后记为0 h。分别在0 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h和5 d时取样,每次每个平行取5尾鱼。麻醉后,尾椎静脉采血1 mL/尾,备用;根据后续实验需求,采集头肾、下丘脑、垂体、肝脏、鳃和皮肤,于-80 °C保存备用,考虑到实验前期和晚期组织水平上的变化可能尚未出现和恢复,仅采集24 h鳃、肝脏、脾、肠和肾脏固定于4%中性甲醛供常规组织学分析。

1.4 样品处理

采集的血液以ACCU-CHEK Pertorma血糖仪(罗氏)直接获取血糖数据;剩余血液随即离心(7 500 r/min, 4 °C, 5 min),收集血清,保存于-20 °C备用。血清皮质醇通过化学发光免疫竞争法在MAGLUMI 1000全自动化学发光免疫分析仪上进

行检测(皮质醇测定试剂盒购自深圳新产业生物医学工程有限公司)。

组织样品采用高通量组织破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司)匀浆后,根据试剂盒RNAiso Plus (TaKaRa,大连宝生物工程有限公司)说明抽提总RNA,经NanoDrop 2000(Thermo Scientific,美国)检测RNA质量后调整浓度,最终以800 µg RNA总量,按试剂盒PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa,大连宝生物工程有限公司)说明(第一步反应体系及反应参数:5×gDNA eraser buffer, 2.0 µL; gDNA eraser, 1.0 µL; Total RNA, 2.0 µL; RNase free dH₂O, 5.0 µL; 42 °C, 2 min, 存储于4 °C。第二步反应体系及反应参数:第一步反应后的溶液, 10.0 µL; 5×prime script buffer 2, 4 µL; prime script RT eraser Mix I, 1.0 µL; script RT primer Mix, 1.0 µL; RNase free dH₂O, 4.0 µL; 37 °C, 15 min, 85 °C, 5 s。存储于4 °C)反转录合成cDNA,获得产物于-20 °C保存备用。

1.5 引物设计与合成

本实验所用引物均列于表1。其中内参基因 β -actin引物参照董晶晶等^[23]。根据实验室获得的转录组数据,对团头鲂闭合蛋白基因 occ 、糖代谢相关基因 $pepck$ 以及 gr 序列信息采用Primer 5.0设计荧光定量特异性引物,所有的引物合成及序列测定由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

表1 团头鲂实时荧光定量PCR所用引物

| Tab. 1 Primers used for <i>M. amblycephala</i> quantitative Real-time PCR reactions | |
|---|--------------------------------|
| 引物 primer | 序列(5' -3') primer sequences |
| β -actin-F | TCGTCCACCGCAAATGCTTCTA |
| β -actin-R | CCGTCACCTTACCGTTCCAGT |
| $gr2$ -F | CCCACTCTTGAGGAGCACAG |
| $gr2$ -R | TTGAAGGGGAGGCGCTATTG |
| $gr1$ -F | CATCCAGTCGCAGGACACTT |
| $gr1$ -R | CTCGTGGCCATCCATTTCTT |
| $occ1$ -F | ATCAAGTCACCTCTCTCCGT |
| $occ1$ -R | GGGTGATGTCCAGCGGTAAA |
| $pepck1$ -F | GGAGGAATGGGACAAAGCCA |
| $pepck1$ -R | GAGAGTCGGTCAGTTCCACG |

1.6 实时荧光定量PCR

实时荧光定量PCR (qRT-PCR)结果通过相对标准曲线法进行校正。qRT-PCR反应采用SYBR Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)试剂盒,在ABI PRISM 7500 Real-time PCR System仪器上进行检测和分析。参数设置参照Xue等^[24],定量PCR体系为20 µL: 2 µL cDNA模板、10 µL SYBR green mix、0.4 µL ROX、6.8 µL H₂O,正反引物各0.4 µL;反应程序设置:第一阶段(50 °C, 2 min; 95 °C, 3 min),第二阶段(95 °C, 15 s; 60 °C, 1 min; 40次循环),第三阶段(95 °C, 15 s; 60 °C, 1 min; 95 °C, 30 s; 60 °C, 15 s)。阴性对照,以灭菌双蒸水代替cDNA模板;每个样品重复3次。

1.7 组织病理分析

组织样品经24 h固定后,常规脱水、石蜡包埋,以5~8 µm切片,常规制片H.E染色后镜检分析。

1.8 数据统计

以相对标准曲线法分析目的基因在组织中的表达量。数据差异显著性分析使用SPASS 18.0 (SPASS Inc., Chicago)软件中的单因素方差(One-Way ANOVA)和独立样本 t 检验(independent samples t -test)分析,显著性水平设置为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 团头鲂 gr 的组织分布特征

团头鲂糖皮质激素1型受体基因($gr1$)在心脏、脾脏、鳃、头肾、卵巢以及皮肤中的表达丰度较高,显著高于其他组织($P < 0.05$)。和 $gr1$ 表达分布不同,团头鲂糖皮质激素2型受体基因($gr2$)在肝脏、下丘脑、垂体、肠、精巢以及肌肉中的表达丰度更高,其表达量显著高于其他组织($P < 0.05$)(图1)。

2.2 应激模拟

模拟应激处理后,实验组血清皮质醇水平在0 h即观察到显著升高($P < 0.05$),高于对照组皮质醇水平6倍;在2 h达到峰值(此时实验组皮质醇含量为对照组皮质醇含量的18.1倍),之后呈下降趋势,但持续高皮质醇水平直到12 h才恢复到平静状态(实验组皮质醇含量组内无显著差异,且

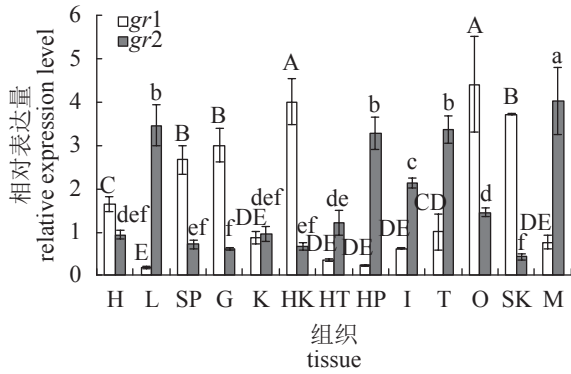


图1 gr在团头鲂不同组织中的表达分布情况

H.心脏; L.肝脏; SP.脾脏; G.鳃; K.肾脏; HK.头肾; HT.下丘脑; HP.垂体; I.肠; T.精巢; O.卵巢; SK.皮肤; M.肌肉。图中不同大小写字母分别表示gr1和gr2在不同组织中的表达差异显著 (P<0.05)

Fig. 1 Tissue-specific expression of gr in M. amblycephala

H. heart; L. liver; SP.spleen; G. gill; K. kidney; HK. head kidney; HT. hypothalamus; HP. pituitary; I. intestine; T. testis; O.ovary; SK. skin; M. muscle. Different letter indicates statistical difference between different tissues in gr1 and gr2 (P<0.05)

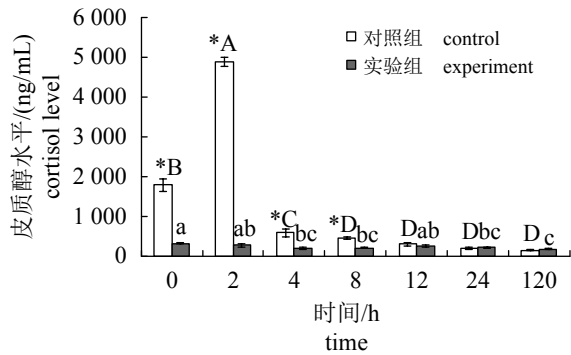


图2 模拟应激恢复过程中血清cortisol水平的变化

*.同一时间点实验组和对照组差异显著(P<0.05); 柱状图上方不同的大小写字母表示实验组和对照组内在不同时间点差异显著(P<0.05); 下同

Fig. 2 Effects on serum cortisol level during recovery from exogenous cortisol-stress

* indicates statistical difference between different treatment at the same time (P<0.05) means statistical difference at the same point of time (P<0.05), different letter indicates statistical difference between different recovering time in experimental group and control group (P<0.05); the same below

与对照组皮质醇含量无显著差异)。相对而言, 对照组皮质醇水平升高时间短, 达到峰值水平低, 恢复速率快, 高皮质醇水平维持时间短, 在2 h左右就基本恢复了平静状态, 组内皮质醇水平在2 h之后, 除12 h与5 d 2个时间点之间的皮

质醇水平有显著差异外, 其他时间点皮质醇水平无显著差异(图2)。

血糖水平变化在实验处理后表现出一定的滞后性, 直到在2 h时才观察到血糖显著升高的现象(P<0.05), 并且2~24 h期间血糖水平维持在14 mmol/L左右, 直到24 h后才恢复到10 mmol/L左右(图3)。对照组个体在整个实验期间, 其血糖水平都维持在10 mmol/L左右, 组内无显著差异。综上所述, 本次实验中成功地诱导了团头鲂急性应激事件。

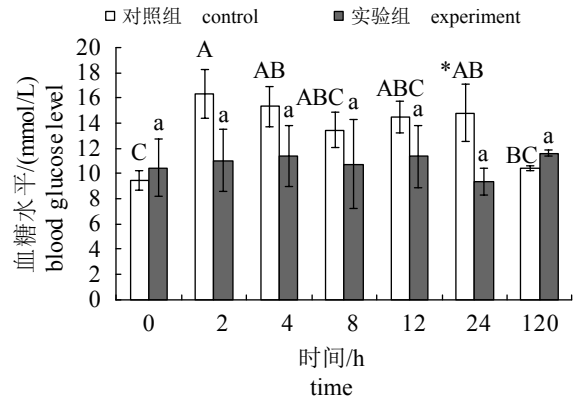


图3 模拟应激恢复过程中血糖水平的变化

Fig. 3 Effects on blood glucose level during recovery from exogenous cortisol-stress

2.3 模拟应激恢复过程中HPI轴上gr的表达变化

下丘脑中, gr1在胁迫恢复期间存在表达量波动的情况, 实验组和对照组gr1表达量的变化趋势基本一致。实验组gr1表达量在0和4 h时显著高于其他时间点(P<0.05); 而与对照组相比, 皮质醇注射后gr1表达量在2和4 h显著下调(P<0.05)。对照组中, gr1表达量在0、2和4 h时显著高于8和24 h时(P<0.05)(图4-a)。gr2表达量只在皮质醇注射后0 h出现了显著上调(P<0.05), 与对照组相比, 仅在0 h观察到了表达量显著升高的情况(P<0.05)。对照组中, 各时间点gr2表达量无显著差异(图4-b)。gr1/gr2值在应激处理后处于低值水平, 而在恢复过程中呈升高趋势(图4-c)。

在垂体中, 实验组gr1表达量出现了先升高后下降的变化, 其在2 h的表达量显著高于其他时间点(P<0.05), 而在4 h的表达量显著低于其他时间点(P<0.05), 但和对照组相比, 均无显著性差异。在对照组中, 0、2和4 h gr1表达量显著高

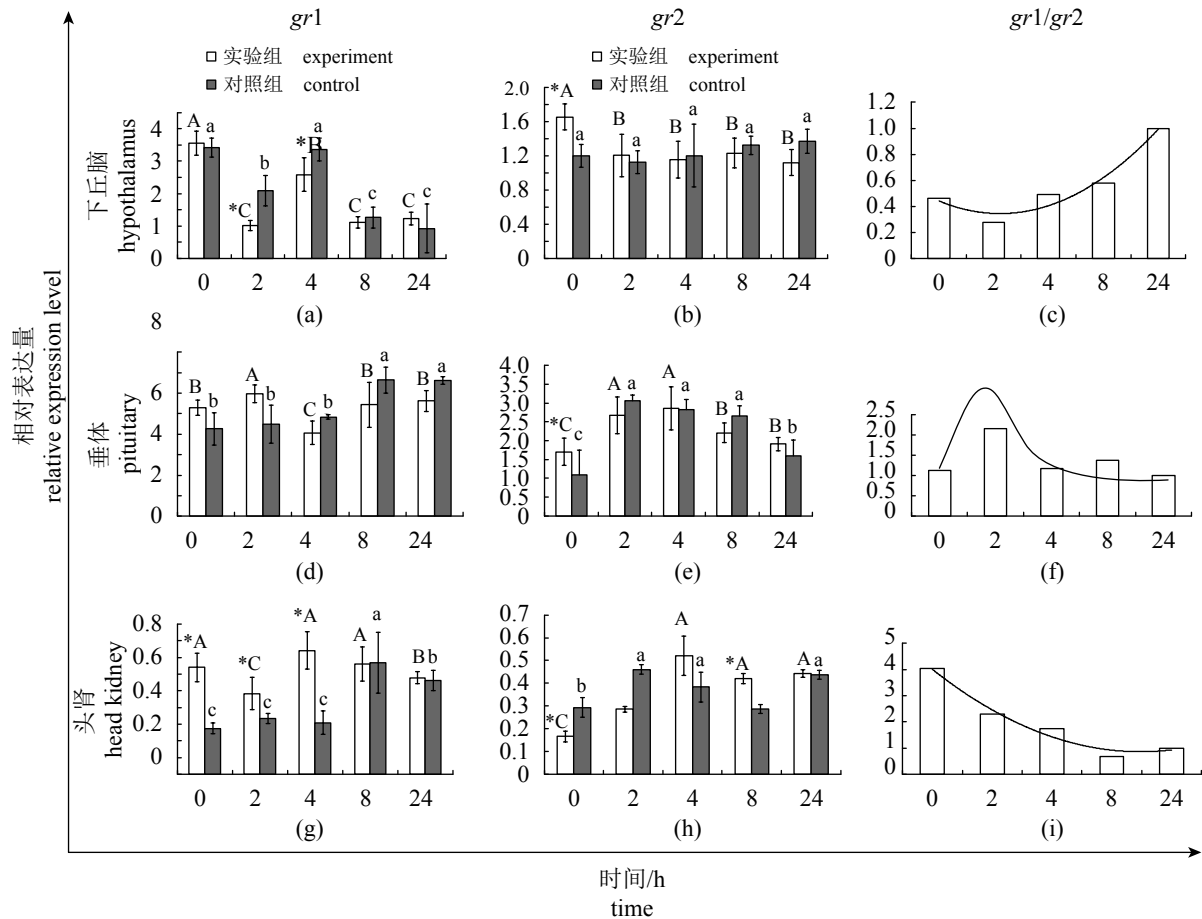


图4 模拟应激恢复过程中团头鲂HPI轴上 gr 的变化

Fig. 4 Expression of gr in HPI axis of *M. amblycephala* during recovery from exogenous cortisol-stress

于8和24 h的表达量($P < 0.05$)(图4-d)。而 $gr2$ 在实验组中表现出和对照组一致的单峰型变化趋势;实验组中 $gr2$ 基因表达量仅在0 h显著高于对照组($P < 0.05$),其表达量峰值出现在4 h,但其表达量与对照组并无显著差异;对照组2、4和8 h $gr2$ 表达量显著高于0和24 h的表达量($P < 0.05$),峰值出现在2 h(图4-e)。应激处理后其 $gr1/gr2$ 值在2 h时达到峰值,其他时间点比值都基本一致(图4-f)。

在头肾中,实验组 $gr1$ 表达量存在波动,其表达量0、4和8 h显著高于2和24 h时($P < 0.05$),与对照组相比, $gr1$ 在0、2和4 h的表达量显著上调($P < 0.05$)。在对照组中, $gr1$ 在0、2和4 h的表达量显著低于8和24 h时($P < 0.05$)(图4-g)。而 $gr2$ 在0 h和2 h的表达量显著低于4、8和24 h时($P < 0.05$),与对照组相比, $gr2$ 在0和2 h的表达量显著下调($P < 0.05$),8 h时表达量显著升高($P < 0.05$)(图4-h)。应激处理后 $gr1/gr2$ 值在头肾中的变化趋势与下丘脑中的表现不同,这一比值在早期处于较高水平,

然后在恢复过程中呈逐渐降低的趋势(图4-i)。

2.4 模拟应激恢复过程中肝脏 gr 、 $pepck$ 的表达变化

实验组肝脏中 $gr1$ 在胁迫恢复期间的变化趋势呈单峰型,在0和2 h时 $gr1$ 的表达量显著高于其他时间点的表达量($P < 0.05$),4、8和24 h的表达量无显著差异,峰值水平出现在2 h;与对照组相比,0和2 h时表达量显著升高,8和24 h时表达量有所降低($P < 0.05$),而4 h时无显著差异。对照组中,0、8和24 h $gr1$ 的表达量显著高于其他时间点($P < 0.05$)(图5-a)。实验组 $gr2$ 转录表达在2和4 h显著高于其他时间点($P < 0.05$),与对照组相比,2 h $gr2$ 基因的表达显著上调,而4 h时表达量有所降低($P < 0.05$);对照组内0、2和4 h $gr2$ 基因的表达量显著低于8和24 h($P < 0.05$)(图5-b)。 $gr1/gr2$ 比值呈减小的趋势,在2 h处有峰值出现(图5-c)。 $pepck$ 的表达峰值出现在2 h,实验组和对照组具有相近的峰值水平,但实验组维持高表达水平更

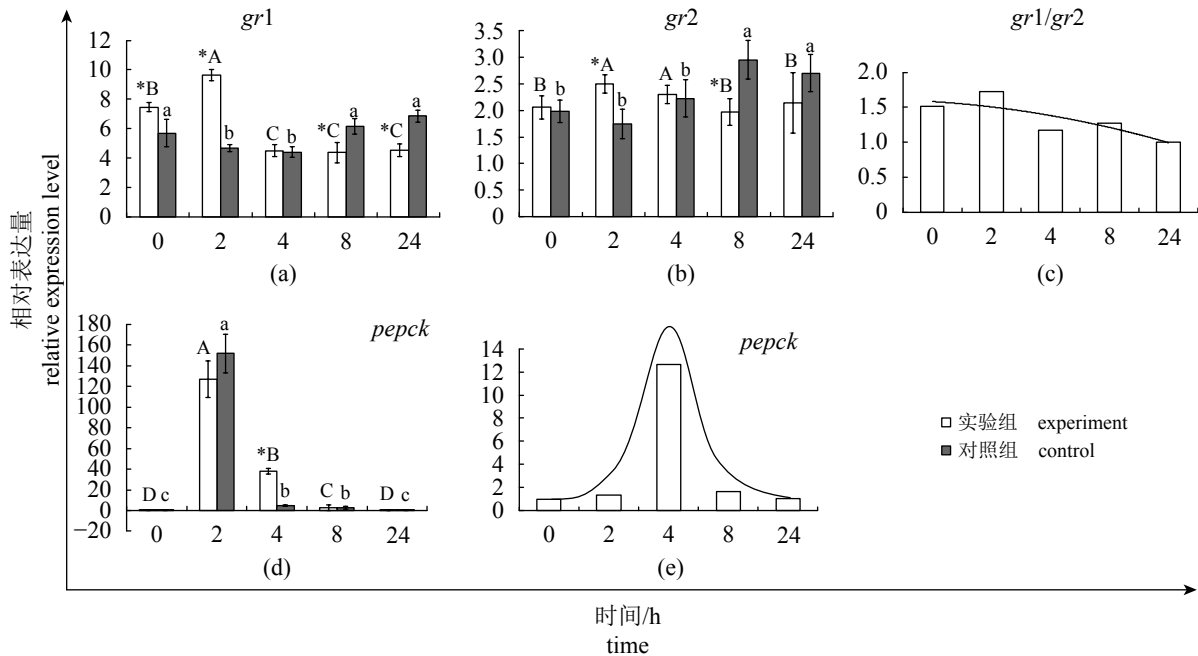


图5 模拟应激恢复过程中团头鲂肝脏中 gr 、 $pepck$ 的表达变化

Fig. 5 Expression of gr and $pepck$ in liver of *M. amblycephala* during recovery from exogenous cortisol-stress

为持久(图5-d);以实验组数据和对照组数据的比值进行绘图,图像显示出的变化趋势与独立绘图所呈现的趋势基本一致,但峰值位置发生了左移(图5-e)。

2.5 模拟应激恢复过程中皮肤 gr 与 occ 的表达变化

在对皮肤的研究中发现,实验组 $gr1$ 在2、4和8 h的表达量显著高于0和24 h的表达量($P < 0.05$),与对照组相比,2和8 h的表达量显著升高($P < 0.05$);对照组内 $gr1$ 在4 h的表达量显著高于其他时间点($P < 0.05$),而其他时间点之间的表达量无显著差异(图6-a)。实验组 $gr2$ 的表达量在0 h和2 h显著低于其他时间点,且在0 h的转录水平显著低于对照组($P < 0.05$);而在对照组内存在相似的变化趋势, $gr2$ 表达量在0和2 h同样显著低于其他时间点的表达量($P < 0.05$)(图6-b)。 $gr1/gr2$ 比值趋势线呈现出先增大再减小的趋势,且其峰值出现在2~4 h区间内(图6-c)。而实验组皮肤 occ 的表达变化与对照组的变化趋势基本一致,呈现出先升高、再降低的趋势,其峰值水平均出现在4 h,且其峰值水平显著高于对照组($P < 0.05$)(图6-d);以实验组数据和对照组数据的比值进行绘图,图像显示出的 occ 的表达变化趋势与独立绘图所呈现的趋势并不一致,其在0和2 h的数值低于其他时间,且没有观察到明显的峰值出现

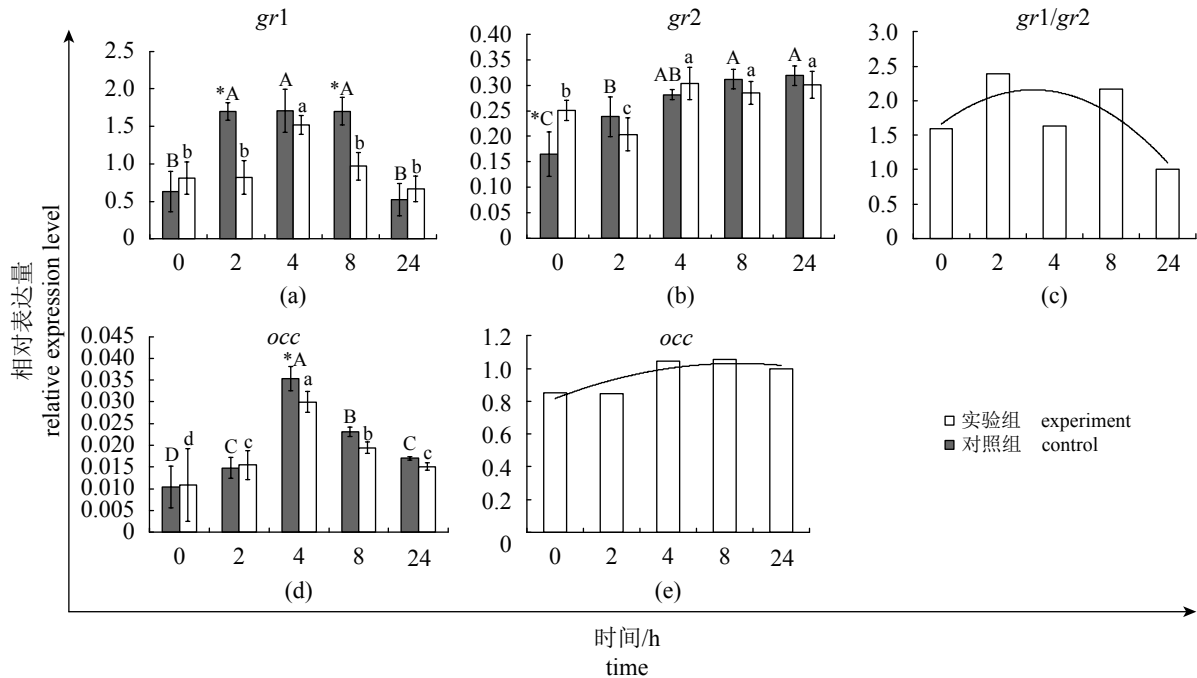
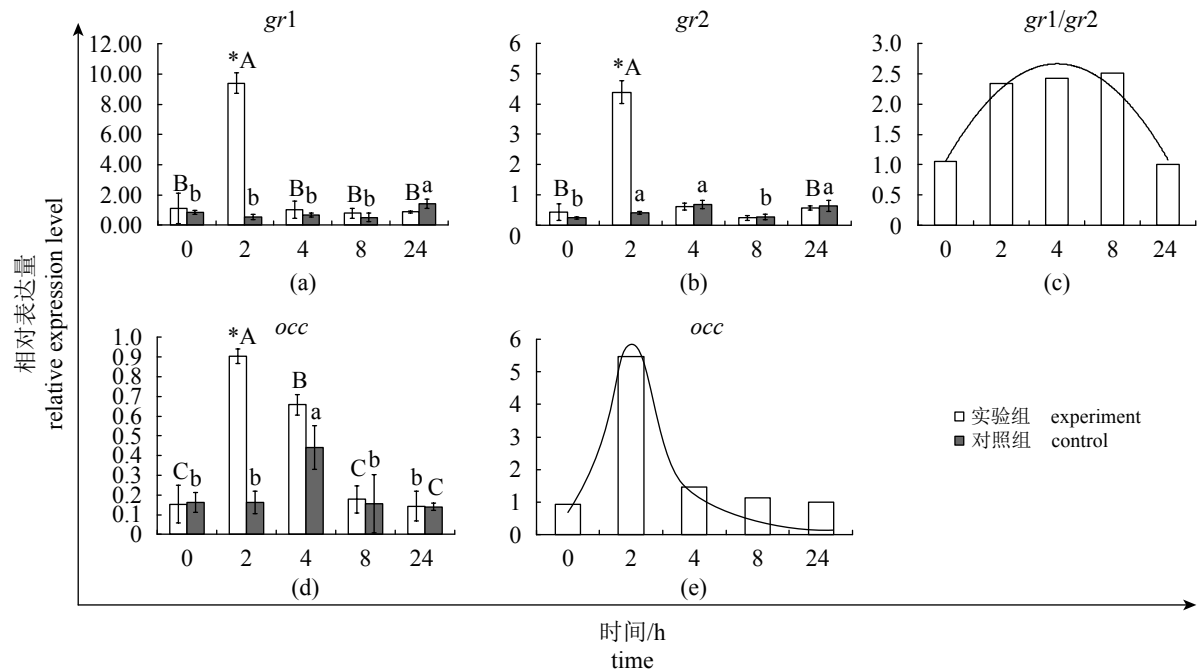
(图6-e)。

2.6 模拟应激恢复过程中鳃 gr 与 occ 的表达变化

对鳃 $gr1$ 表达检测结果显示,实验组中仅在2 h处观察到了转录水平显著上调,且与对照组相比,其表达量也显著升高($P < 0.05$);对照组中 $gr1$ 表达基本稳定,仅在24 h处有显著升高的现象($P < 0.05$)(图7-a)。实验组 $gr2$ 的表达情况与 $gr1$ 表达情况一致,其表达量的显著升高只在2 h处被观察到,且其表达量显著高于对照组转录水平($P < 0.05$);而对照组内 $gr2$ 的表达存在一定程度的波动,0和8 h的表达量显著低于其他时间点($P < 0.05$)(图7-b)。 $gr1/gr2$ 比值趋势线呈单峰型,峰值水平在4 h附近,而2、4和8 h数据超过0和24 h数据的2倍(图7-c)。实验组 occ 的表达变化趋势呈单峰型,在2 h时达到了峰值水平,且其表达量显著高于对照组水平($P < 0.05$),峰值出现时间早于对照组(图7-d);以实验组数据和对照组数据的比值进行绘图,图像显示出的 occ 的表达变化趋势与独立绘图所呈现的趋势一致,峰值位置未发生变化(图7-e)。

2.7 应激反应对组织结构的影响

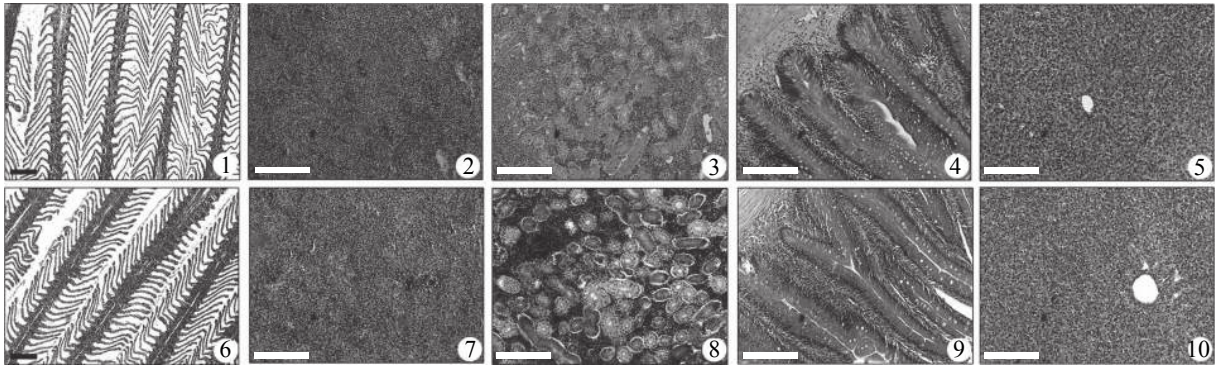
H.E染色结果显示,实验组鳃丝基部细胞增多,存在鳃丝增生的现象;脾脏中偶见含铁血黄素沉积,与对照组相比没有观察到明显病理

图 6 模拟应激恢复过程中团头鲂皮肤中 *gr*、*occ* 的表达变化Fig. 6 Expression of *gr* and *occ* in skin of *M. amblycephala* during recovery from exogenous cortisol-stress图 7 模拟应激恢复过程中团头鲂鳃中 *gr*、*occ* 的表达变化Fig. 7 Expression of *gr* and *occ* in gill of *M. amblycephala* during recovery from exogenous cortisol-stress

改变; 肾脏肾间组织中类淋巴细胞增多, 肾小管与肾间组织出现一定程度的分离现象; 肠道绒毛结构完整, 可见一定数量的杯状细胞, 无明显病理改变; 肝脏小叶结构不明显, 中央静脉附近没有发现明显病理变化(图版)。

3 讨论

gr 广泛地表达于团头鲂各种组织中, 暗示了其广泛参与机体功能活动的生物学意义。哺乳动物中的研究显示, 海马区高表达量的 GR,



图版 急性应激对团头鲂组织结构的影响

1~5 分别为对照组鳃、脾脏、肾脏、肠、肝脏；6~10分别为实验组鳃、脾脏、肾脏、肠、肝脏

Plate The effect of acute stress on histology

1-5 are the gills, spleen, kidney, intestine and liver of the control fish; 6-10 are gills, spleen, kidney, intestine and liver of the experiment fish (Bars=200 μm)

与其参与HPA轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis)功能调节密切相关^[25]。而GR在下丘脑CRH神经元和ACTH分泌细胞中的存在也暗示了GR对HPA轴在GC合成方面的调控作用^[26]。HPI轴和HPA轴作为同源结构，基于脊椎动物进化的保守性，团头鲂HPI轴相应组织器官中 gr 的转录表达意味着相似的调节功能。

团头鲂 gr 在HPI轴之外的组织中广泛表达的现象和其他物种中的研究结果一致^[27-28]，而GR在这些组织器官中常常涉及对应组织器官的相关功能。例如，Kumai等^[29]在斑马鱼(*Danio rerio*)中就证实了GR参与了鳃的渗透压调节活动。而Vijayan等^[20]在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)应激相关研究中也观察到了GR与肝脏糖代谢的密切关系。此外，在鲤^[14]、黑鲈^[18]、金头鲷^[19]体内，关于应激与免疫的研究中也发现了皮质醇经由GR介导的免疫相关基因的表达变化^[14]，免疫细胞相关功能抑制^[18]和损伤^[19]。因此，团头鲂 gr 在这些组织中的转录表达极有可能与其参与的机体活动相关。

HPI轴的活动主要参与了鱼类应激适应，而GR系统又与应激现象紧密相关，因此，探明应激反应中HPI轴上GR的表达变化与其涉及的调节规律具有重要意义。然而，团头鲂在模拟应激恢复期间，HPI轴上 $gr1/gr2$ 的变化反映出不同亚型不一致的变化趋势，并且在不同器官中出现不同的变化情况，在一定程度上反映出在HPI轴上相关调控信息的复杂性。这种调控机制的复杂性可能是在进化过程中面临复杂环境而形成的GR系统维稳机制。目前在人类医学研究中有

观察到GC引起GR亚型组成比例改变，进而影响机体对GC应答的现象^[30]。并且杨玲等^[30]指出通常转录库中每种受体亚型的mRNA比例一定，而相关药物的使用会影响到这一比值，升高了的 $hGR\beta$ 比率导致激素耐受产生。此外，不同亚型之间的作用关系也并非只有竞争($hGR\beta$ 通过和 $hGR\alpha$ 竞争GC而导致了激素耐受)，程晓刚等^[31]在关于GR的综述中提及了具有增强 $hGR\alpha$ 的转录活性的 $hGR-p$ 。因此应激反应中GR的调控机制可能不局限于受体亚型比例方面，还存在受体间相互作用方式的调控，这种调控作用的多样性一方面让机体适应复杂的环境提供了可能，另一方面也为明晰具体调控机制带来了困难。而鱼类方面的相关研究尚显薄弱，在团头鲂中关于不同受体亚型的监测也只能为了解亚型间的可能互作关系，以及应激反应过程中的调节机制提供思路，将来仍然需要更为深入的研究。

团头鲂肝脏 $pepck$ 的表现与其他鱼类中的研究结果类似^[20, 32-33]，应激事件发生之后， $pepck$ 的表达出现了上调，且其表达相对滞后于GR基因的表达变化。而在高等动物的研究中已证实，GR参与了机体糖代谢活动，且GR在配体的激活下，能诱导相关代谢酶的转录表达^[34]。此外，与 $gr2$ 相比， $gr1$ 和 $pepck$ 的变化趋势具有更高的相关性。然而团头鲂具体受体亚型与糖代谢中关键酶类的表达作用机制有待进一步验证。

皮肤是鱼类重要的先天免疫屏障，在结构上和高等动物肠道黏膜屏障有相似之处，其紧密连接蛋白作为屏障的重要构成，对行使屏障功能意义重大。已有研究表明紧密连接蛋白的

减少会造成肠道黏膜屏障通透性增加, 进而导致机体对病原微生物的抵抗力下降, 增加机体患病风险^[35]。Duncan等^[36]在其研究中指出, 类固醇激素通过GR影响了紧密连接蛋白的表达, 因此虹鳟在应激事件之后出现的肠道屏障功能的损伤, 很有可能与紧密蛋白表达下调相关^[37], 本实验中闭合蛋白(OCC)在应激反应发生后出现了表达下调现象, 这暗示了可能出现的鱼体屏障功能损伤以及随应激反应而增加的病原微生物侵袭风险。但由于紧密连接蛋白种类繁多^[38], 本次研究仅仅涉及了闭合蛋白(OCC), 其他紧密连接蛋白基因的表达变化有待补充, 应激反应和团头鲂皮肤屏障的影响有待进一步研究。

鳃是鱼类渗透压调节器官之一, 研究表明鱼类可以通过紧密连接蛋白的表达来实现对渗透压的调控^[39-41]。此外, 鳃还是鱼类的呼吸器官, 壁薄、面积大、毛细血管丰富, 机体为避免离子流失, 在外界应激刺激下易出现补偿性细胞增殖, 但这种增殖若长期存在, 则会引起鳃组织病理性增生。在本研究中观察到鳃小片基部细胞数量增加的情况, 而OCC作为细胞间的结构组成成分, 其含量理论上也和细胞数量成正比, 在应激事件发生后的早期也观察到了表达上调的情况, 这一结果和Chasiotis等^[39]在细胞水平上的观测结果一致, 并且其研究指出皮质醇通过增加OCC丰度, 可以减少细胞旁通透性。由此可见鱼体在应激反应中可以通过鳃部GR对渗透压进行调节, 但若是长期处于应激状态下, GR的这种调节作用可能增加鳃部病理增生的风险。

感谢李宁在数据分析方面给予的帮助和指导。

参考文献:

- [1] Malandrakis E E, Dadali O, Golomazou E, *et al.* DNA damage and differential gene expression associated with physical stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 236: 98-104.
- [2] Schreck C B. Stress and fish reproduction: the roles of allostasis and hormesis[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(3): 549-556.
- [3] Genova R M, Marchaterre M A, Knapp R, *et al.* Glucocorticoid and androgen signaling pathways diverge between advertisement calling and non-calling fish[J]. *Hormones and Behavior*, 2012, 62(4): 426-432.
- [4] Small B C, Bilodeau A L. Effects of cortisol and stress on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) pathogen susceptibility and lysozyme activity following exposure to *Edwardsiella ictaluri*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 142(1-2): 256-262.
- [5] 刘小玲. 鱼类应激反应的研究[J]. *水利渔业*, 2007, 27(3): 1-3.
Liu X L. Studies on the emergency responses of fishes[J]. *Reservoir Fisheries*, 2007, 27(3): 1-3(in Chinese).
- [6] Duma D, Jewell C M, Cidlowski J A. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification[J]. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 2006, 102(1-5): 11-21.
- [7] 曾灵, 顾玮, 严军, 等. 人糖皮质激素受体调控靶基因的生物信息学分析[J]. *基础医学与临床*, 2008, 28(11): 1146-1150.
Zeng L, Gu W, Yan J, *et al.* Bioinformatics analysis of human glucocorticoid receptor regulated target genes[J]. *Basic & Clinical Medicine*, 2008, 28(11): 1146-1150(in Chinese).
- [8] Bongiovanni B, Mata-Espinosa D, D' Attilio L, *et al.* Effect of cortisol and/or DHEA on THP1-derived macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Tuberculosis*, 2015, 95(5): 562-569.
- [9] Robert O, Boujedidi H, Bigorgne A, *et al.* Decreased expression of the glucocorticoid receptor-GILZ pathway in Kupffer cells promotes liver inflammation in obese mice[J]. *Journal of Hepatology*, 2016, 64(4): 916-924.
- [10] Oh K S, Patel H, Gottschalk R A, *et al.* Anti-inflammatory chromatin landscape suggests alternative mechanisms of glucocorticoid receptor action[J]. *Immunity*, 2017, 47(2): 298-309.
- [11] Dieken E S, Miesfeld R L. Transcriptional transactivation functions localized to the glucocorticoid receptor N terminus are necessary for steroid induction of lymphocyte apoptosis[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1992, 12(2): 589-597.
- [12] Kitajima T, Ariizumi K, Bergstresser P R, *et al.* A novel mechanism of glucocorticoid-induced immune suppression: the inhibition of T cell-mediated terminal maturation of a murine dendritic cell line[J]. *Journal of*

- Clinical Investigation, 1996, 98(1): 142-147.
- [13] Beato M, Herrlich P, Schütz G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot[J]. *Cell*, 1995, 83(6): 851-857.
- [14] Saeij J P J, Verburg-Van Kemenade L B M, Van Muiswinkel W B, *et al.* Daily handling stress reduces resistance of carp to *Trypanoplasma borreli*: *in vitro* modulatory effects of cortisol on leukocyte function and apoptosis[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2003, 27(3): 233-245.
- [15] Gadan K, Marjara I S, Sundh H, *et al.* Slow release cortisol implants result in impaired innate immune responses and higher infection prevalence following experimental challenge with infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(5): 637-644.
- [16] Chasiotis H, Kelly S P. Effect of cortisol on permeability and tight junction protein transcript abundance in primary cultured gill epithelia from stenohaline goldfish and euryhaline trout[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2011, 172(3): 494-504.
- [17] Mateus A P, Anjos L, Cardoso J R, *et al.* Chronic stress impairs the local immune response during cutaneous repair in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.)(J). *Molecular Immunology*, 2017, 87: 267-283.
- [18] Vizzini A, Vazzana M, Cammarata M, *et al.* Peritoneal cavity phagocytes from the teleost sea bass express a glucocorticoid receptor (cloned and sequenced) involved in genomic modulation of the *in vitro* chemiluminescence response to zymosan[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2007, 150(1): 114-123.
- [19] Esteban M A, Rodríguez A, Ayala A G, *et al.* Effects of high doses of cortisol on innate cellular immune response of seabream (*Sparus aurata* L.)(J). *General and Comparative Endocrinology*, 2004, 137(1): 89-98.
- [20] Vijayan M M, Raptis S, Sathiyaa R. Cortisol treatment affects glucocorticoid receptor and glucocorticoid-responsive genes in the liver of rainbow trout[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2003, 132(2): 256-263.
- [21] Olsen R E, Sundell K, Ringø E, *et al.* The acute stress response in fed and food deprived Atlantic cod, *Gadus morhua* L[J]. *Aquaculture*, 2008, 280(1-4): 232-241.
- [22] Mazon A F, Huising M O, Taverne-Thiele A J, *et al.* The first appearance of Rodlet cells in carp (*Cyprinus carpio* L.) ontogeny and their possible roles during stress and parasite infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(1-2): 27-37.
- [23] 董晶晶, 薛春雨, 习丙文, 等. 团头鲂黑素皮质素受体2基因克隆、组织分布和应激后的表达分析[J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(6): 20-26.
- Dong J J, Xue C Y, Xi B W, *et al.* Gene cloning, tissue distribution and expression after stress of melanocortin receptor 2 in *Megalobrama amblycephala*[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2014, 42(6): 20-26(in Chinese).
- [24] Xue C Y, Xi B W, Ren M C, *et al.* Molecular cloning, tissue expression of gene Muc2 in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* and regulation after re-feeding[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2015, 33(2): 291-298.
- [25] 常波, 高珊珊, 郭琪, 等. 辽东椴木根皮和人参茎叶总皂苷提取物对过度训练大鼠海马盐皮质类固醇受体MR、糖皮质激素受体GR蛋白表达的影响[J]. *广州体育学院学报*, 2014, 34(3): 94-97, 106.
- Chang B, Gao S S, Guo Q, *et al.* Empirical study of A. Elata and panax ginseng extracts on the MR, GR protein expression of hippocampus tissue in the overtraining rat[J]. *Journal of Guangzhou Sport University*, 2014, 34(3): 94-97, 106(in Chinese).
- [26] 万顺伦, 徐建军, 孙刚. 脑内皮质激素受体及其受体前代谢酶的作用[J]. *生理科学进展*, 2001, 32(2): 171-173.
- Wan S L, Xu J J, Sun G. The actions of glucocorticoid receptor and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases in the brain[J]. *Progress in Physiological Sciences*, 2001, 32(2): 171-173(in Chinese).
- [27] Small B C, Quiniou S M A. Characterization of two channel catfish, *Ictalurus punctatus*, glucocorticoid receptors and expression following an acute stressor[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2018, 216: 42-51.
- [28] 陶争荣, 张昊, 曾涛, 等. 鸽子GR基因cDNA克隆与表达分析[J]. *农业生物技术学报*, 2016, 24(1): 83-89.
- Tao Z R, Zhang H, Zeng T, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of GR gene in pigeon (*Columba livia domestica*)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(1): 83-89(in Chinese).
- [29] Kumai Y, Nesan D, Vijayan M M, *et al.* Cortisol regulates Na⁺ uptake in zebrafish, *Danio rerio*, larvae via

- the glucocorticoid receptor[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2012, 364(1-2): 113-125.
- [30] 杨玲, 何威, 李颖. 地塞米松给药及撤药后糖皮质激素受体的表达[J]. *第三军医大学学报*, 2009, 31(21): 2086-2089.
- Yang L, He W, Li Y, *et al.* Expression of glucocorticoid receptor in HaCaT cells under dexamethasone treatment or after withdrawal[J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2009, 31(21): 2086-2089(in Chinese).
- [31] 程晓刚, 粟永萍, 罗成基. 糖皮质激素受体结构与功能研究进展[J]. *国外医学分子生物学分册*, 2003, 25(1): 29-33.
- Cheng X G, Su Y P, Luo C J. The structure and function of glucocorticoid receptor[J]. *Foreign Medical Science Molecular Biology Section*, 2003, 25(1): 29-33(in Chinese).
- [32] Terova G, Gornati R, Rimoldi S, *et al.* Quantification of a glucocorticoid receptor in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) reared at high stocking density[J]. *Gene*, 2005, 357(2): 144-151.
- [33] Patterson S, Zee J, Wiseman S, *et al.* Effects of chronic exposure to dietary selenomethionine on the physiological stress response in juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2017, 186: 77-86.
- [34] Greulich F, Hemmer M C, Rollins D A. There goes the neighborhood: assembly of transcriptional complexes during the regulation of metabolism and inflammation by the glucocorticoid receptor[J]. *Steroids*, 2016, 114: 7-15.
- [35] 李呈贞. 小檗碱治疗肠道炎症的机制研究[J]. *现代免疫学*, 2013, 33(1): 74-76, 11.
- Li C Z. The mechanism of berberine in inflammatory bowel diseases[J]. *Modern Immunology*, 2013, 33(1): 74-76, 11(in Chinese).
- [36] Duncan A R, Sadowska G B, Stonestreet B S. Ontogeny and the effects of exogenous and endogenous glucocorticoids on tight junction protein expression in ovine cerebral cortices[J]. *Brain Research*, 2009, 1303: 15-25.
- [37] Olsen R E, Sundell K, Mayhew T M, *et al.* Acute stress alters intestinal function of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)[J]. *Aquaculture*, 2005, 250(1-2): 480-495.
- [38] Gauberg J, Kolosov D, Kelly S P. Claudin tight junction proteins in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin: spatial response to elevated cortisol levels[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2017, 240: 214-226.
- [39] Chasiotis H, Wood C M, Kelly S P. Cortisol reduces paracellular permeability and increases occludin abundance in cultured trout gill epithelia[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2010, 323(2): 232-238.
- [40] Kelly S P, Chasiotis H. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors regulate paracellular permeability in a primary cultured gill epithelium[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2011, 214: 2308-2318.
- [41] Wood C M, Kelly S P, Zhou B S, *et al.* Cultured gill epithelia as models for the freshwater fish gill[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2002, 1566(1-2): 72-83.

Tissue distribution and expression analyses of *Megalobrama amblycephala* *gr* in stress

CHEN Kai^{1,2}, XI Bingwen^{1,3}, TENG Tao⁴, QIN Ting¹, PAN Liangkun¹, XIE Jun^{1*}

(1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization,
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Freshwater Fisheries Research Center,
Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Hubei Collaborative Innovation Center for Freshwater Aquaculture, Wuhan 430070, China;

4. Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China)

Abstract: In order to understand the biological function of glucocorticoid receptors (GRs) of *Megalobrama amblycephala*, we explored the expression characteristics of *grs* in different tissues and the expression changes of *grs* and some function genes in the recovery process after stress. Results show that the *gr1* was highly expressed in gill, spleen and head kidney, while *gr2* was highly expressed in pituitary, liver, intestinal, and so on. During the recovery process, on HPI axis, the expression of *gr1* had fluctuations, *gr2* significantly up-regulated at the 0 h, and the value of *gr1/gr2* was gradually increasing in hypothalamus. The expression of *gr1* and *gr2* all rose first and then decreased, *gr1/gr2* value reached the peak at 2 h in pituitary. The expression of *gr1* had fluctuations, whereas *gr2* had a low expression at 0 h and 2 h compared with the other time points, *gr1/gr2* value gradually decreased in head kidney. In liver, *gr1* rose in the early time (0 h and 2 h), and *gr2* presented a fluctuating situation, and there was a tendency to reduce the the value of *gr1/gr2*. At the similar time point the expression of *pepck* peaked. In gills *gr1* rose first, and then decreased, while the expression of *gr2* was subdued in the early time (0 h and 2 h), *gr1/gr2* value maintained at a large value during 2-8 h, while the *occ* expression peaked at 2 h. In skin *gr1* and *gr2* rose significantly in 2 h, *gr1/gr2* in 2-8 h also maintained at a large value, and the *occ* expression rose first and then decreased. Histology research shows that gill filament was hyperplasia, lymphocyte-like cells increased kidney tissues, while other organizations examined had no obvious pathological changes. All the results indicate that GRs have a complex regulatory mechanism in the stress, and the histological analysis shows that the risks of pathological changes come from the stress.

Key words: *Megalobrama amblycephala*; glucocorticoid receptor; stress; cortisol; occludin

Corresponding author: XIE Jun. E-mail: xiej@ffrc.cn

Funding projects: Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-45); National Nature Science Foundation of China (31572662)