

## 奥利亚罗非鱼雌激素 $\beta$ 受体两种亚型cDNA的克隆、 组织分布及雌激素对其表达的影响

兰滔<sup>1,2</sup>, 卢迈新<sup>1\*</sup>, 杨丽萍<sup>1</sup>, 叶星<sup>1</sup>, 朱华平<sup>1</sup>, 高风英<sup>1</sup>, 黄樟翰<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东广州 510380;

2. 广东海洋大学水产学院, 广东湛江 524088)

**摘要:**采用 RT-PCR 和 RACE 技术, 克隆了奥利亚罗非鱼  $\beta$  雌激素受体基因 (estrogen receptor  $\beta$ , ER $\beta$ ) 两种亚型的 cDNA 全序列 (ER $\beta$ 1 和 ER $\beta$ 2)。荧光定量 PCR 分析雌雄奥利亚罗非鱼两种亚型的组织分布, 并观察注射外源雌激素对雄性奥利亚罗非鱼下丘脑-垂体-性腺轴雌激素受体 ER $\alpha$  和  $\beta$  ( $\beta$ 1/ $\beta$ 2) 基因表达的影响。序列分析表明, ER $\beta$ 1 cDNA 全长为 4 262 bp, 其中包含 239 bp 5'非编码区, 2 349 bp 3'非编码区和 1 674 bp 的开放阅读框, 共编码 557 个氨基酸。ER $\beta$ 2 cDNA 全长为 2 506 bp, 包含 5'非编码区 393 bp, 3'非编码区 109 bp, 阅读框为 2 004 bp, 共编码 667 个氨基酸。氨基酸序列同源性分析显示奥利亚罗非鱼 ER $\beta$ 1 与尼罗罗非鱼的相似性高达 99.1%, 而与鲈形目其它鱼类的相似性为 82.6%~94.2%。ER $\beta$ 2 氨基酸序列与尼罗罗非鱼的相似性为 98.7%, 与大口黑鲈、虹鳟、底鳉及斑马鱼的相似性分别为 81.8%、76.3%、64.7% 和 55.0%。在系统进化树上奥利亚罗非鱼的 ER $\beta$ 1 和 ER $\beta$ 2 分别与尼罗罗非鱼的相应受体聚类。奥利亚罗非鱼 ER $\beta$ 1/ $\beta$ 2 基因在所检测的 10 种组织中均有表达。ER $\beta$ 1 基因在卵巢、精巢、肝脏、肾脏和肠等组织的表达量均显著高于其他组织 ( $P < 0.05$ ), 以卵巢的表达量为最高。ER $\beta$ 2 基因在精巢、肝脏及肾脏组织的表达量较高 ( $P < 0.05$ )。ER $\beta$ 1 在卵巢、精巢、肠与下丘脑中的表达量显著高于 ER $\beta$ 2, 其中卵巢中 ER $\beta$ 1 的表达量是 ER $\beta$ 2 的 164 倍。注射雌二醇 (17 $\beta$ -estradiol, E<sub>2</sub>) 24 h 后雄性奥利亚罗非鱼下丘脑 ER $\alpha$ / $\beta$ 1 基因的表达上调, 其中以 ER $\alpha$  的升幅最大, 且存在剂量依赖效应。在 E<sub>2</sub> 高剂量组 (7.5 mg/kg) 下丘脑 ER $\alpha$  的表达量显著升高 ( $P < 0.05$ ), ER $\beta$ 2 基因的表达则没有显著变化。垂体中 3 个基因的表达在中低 E<sub>2</sub> 剂量 (2.5 mg/kg, 5.0 mg/kg) 组均下调, 而在 E<sub>2</sub> 高剂量 (7.5 mg/kg) 组则上升, 其中 ER $\alpha$  的表达量显著升高 ( $P < 0.05$ )。精巢中 ER $\beta$ 2 基因的表达量升高, 以中、高剂量组 (5.0, 7.5 mg/kg) 的升幅最大 ( $P < 0.05$ ), 而 ER $\alpha$ / $\beta$ 1 两个基因的表达量则没有明显变化。ER $\beta$ 1/ $\beta$ 2 的不同组织分布以及雌激素对下丘脑、垂体及性腺 ER $\alpha$ / $\beta$ 1/ $\beta$ 2 的不同的表达调控, 提示奥利亚罗非鱼 3 种 ER 亚型存在着不同的生理功能。

**关键词:** 奥利亚罗非鱼;  $\beta$  雌激素受体; ER $\beta$ 1 和 ER $\beta$ 2; 组织分布; 表达调控

**中图分类号:** Q 786; S 917

**文献标识码:** A

雌激素 (estrogen) 是一种由内分泌系统产生的多效性类固醇性激素, 与动物的生长与繁殖等生命活动密切相关。雌激素通过与特异性受体

(estrogen receptor, ER) 相结合进而调节一系列基因的表达, 影响生殖器官的发育、生殖系统周期变化, 骨骼生长、骨质维持和脑组织内分泌、认知、情

收稿日期: 2009-01-07 修回日期: 2009-09-27

资助项目: 国家科技支撑计划 (2006BAD01A1201); 广东省农业重点项目 (2008A020100006, 2009B020201003); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助; 公益性行业 (农业) 科研专项 (3-49); 广东省海洋渔业科技推广专项 (A200899B02); 广东省重大科技兴渔项目 (A200501B03, A200601B03, B200701A06)

通讯作者: 卢迈新, Tel: 020-81617843, E-mail: mx-lu@163.com

绪及神经营养功能等<sup>[1-2]</sup>。ER 是核受体超家族的重要成员。在这个家族中,所有受体蛋白的分子结构大体相同,可大致划分为六大功能结构域:A/B 区为转录激活区,C 区为 DNA 结合区,D 区为铰链区,E 区为配体结合区,F 区功能未明<sup>[3]</sup>。ER 的 cDNA 序列首先从大鼠 (*Rattus norvegicus*) 子宫中克隆到<sup>[4]</sup>,随后在大鼠、小鼠 (*Mus musculus*) 和人 (*Homo sapiens*) 中陆续发现第二种形式的 ER<sup>[4-6]</sup>。研究发现,两种 ER 分别是位于不同染色体上的不同基因的表达产物,并分别命名为 ER $\alpha$  和 ER $\beta$ 。目前在鱼类中发现 ER 存在多种亚型,其中在金鱼 (*Carassius auratus*)、倒刺鲃 (*Spinibarbus denticulatus*) 和虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 中发现存在 4 种亚型的雌激素受体 (ER $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 和 ER $\beta$ 1/ $\beta$ 2)<sup>[7-9]</sup>;而在斑马鱼 (*Danio rerio*)、底鳉 (*Fundulus heteroclitus*)、大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 和尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)<sup>[10-13]</sup> 等硬骨鱼类中发现 3 种亚型的雌激素受体 (ER $\alpha$  和 ER $\beta$ 1/ $\beta$ 2)。在金鱼、倒刺鲃、虹鳟、底鳉、大口黑鲈及尼罗罗非鱼等鱼类的性腺、肝脏、肾脏和脑组织中均检测到雌激素受体多种亚型的分布<sup>[7-10,12]</sup>。在性腺尚未分化的牙银汉鱼 (*Odontesthes bonariensis*) 中,ER $\alpha$  和 ER $\beta$  两种亚型基因在脑组织均有分布<sup>[14]</sup>;ER $\alpha$  和 ER $\beta$  基因的表达量在大西洋比目鱼 (*Hippoglossus hippoglossus*) 与黑头软口鲷 (*Pimephales promelas*) 中随幼鱼发育阶段增长而逐渐升高<sup>[15-16]</sup>;莫桑比克罗非鱼 (*O. mossambicus*) 幼鱼脑组织 ER $\alpha$  基因表达量随温度降低而下降;雌激素处理莫桑比克罗非鱼后,肝脏 ER $\alpha$  基因表达升高<sup>[17-18]</sup>。雌激素受体基因表达量在上述鱼类中随发育阶段、环境温度或类固醇类激素处理而变化,显示雌激素受体在鱼类性别分化过程中起重要作用。

罗非鱼隶属于鲈形目 (Perciformes), 丽鱼科 (Cichlidae)。由于具有生长快、食性杂和适应性强等特点而成为世界性养殖鱼类品种。但罗非鱼的繁殖周期短,繁殖后代需消耗大量的能量而影响其生长速度。针对罗非鱼个体在生长方面的性别二态性,生产上采用单雄性养殖以提高养殖产量与效益<sup>[19]</sup>。全雄罗非鱼的获得主要通过激素诱导或种间杂交获得。目前养殖较多的奥尼鱼即为尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼 (*O. aureus*) 的杂交

子代。已知奥利亚罗非鱼的遗传性别为 ZZ/ZW,但关于其性别分化与性别控制的分子机制的了解非常有限。Nguan 等<sup>[20]</sup> 在奥利亚罗非鱼中克隆了 ER $\alpha$  受体,但迄今未见奥利亚罗非鱼 ER $\beta$  的研究报道。本研究克隆了奥利亚罗非鱼雌激素  $\beta$  受体两种亚型 ER $\beta$ 1 和 ER $\beta$ 2,采用实时荧光定量方法分析 ER $\beta$ 1 和 ER $\beta$ 2 在奥利亚罗非鱼多个组织中的表达。并观察不同剂量的 17 $\beta$ -雌二醇 (17beta-estradiol, E<sub>2</sub>) 对雄性奥利亚罗非鱼下丘脑、垂体和性腺中 ERs 的表达调控,为进一步开展罗非鱼性别分化与调控的研究提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

实验用奥利亚罗非鱼全长 12 ~ 17 cm, 体重 130 ~ 160 g, 由珠江水产研究所高要水产种质工程中心提供。注射雌二醇 (E<sub>2</sub>) 的实验中,实验鱼随机分为对照组和实验组,每组 6 尾,暂养于水泥池中 1 周,持续充气,水温 28 °C 左右。E<sub>2</sub> 经无水乙醇溶解后用植物油稀释 (体积比 1:100)。腹腔注射 E<sub>2</sub> 量分别为 2.5 mg/kg、5.0 mg/kg 和 7.5 mg/kg。对照组注射无水乙醇:植物油 (1:10) 混合液。注射 24 h 后迅速取实验鱼下丘脑、垂体和精巢组织,置于液氮保存备用。

RNA 抽提试剂盒、DNaseI、质粒提取及胶回收试剂盒均购自 Promega 公司。反转录试剂盒、Taq 酶和 T 载体为 Takara 公司产品。SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 试剂盒购自 ABI 公司。雌二醇 (E<sub>2</sub>) 购于 Sigma 公司。其它试剂为国产分析纯试剂。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  由本实验室保存。

引物设计软件为 Primer Express,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,引物具体参数见表 1。

### 1.2 总 RNA 抽提和纯度鉴定

取奥利亚罗非鱼精巢,用 RNA 抽提试剂盒提取总 RNA。琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,并用分光光度计测量其 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值。

### 1.3 奥利亚罗非鱼雌激素 $\beta$ 受体基因分离

根据已知的鱼类 ER $\beta$ 1 和 ER $\beta$ 2 cDNA 序列的保守区域设计特异性引物 (GenBank accession NO. ER $\beta$ 1: AM284391 和 U75605; ER $\beta$ 2: EU140820 和 DQ462608) (表 1)。取 1 ~ 5  $\mu$ g 总

RNA,用反转录试剂盒进行RT反应合成第一链。以第一链为模板,用特异引物对(ER $\beta$ 1-F/R, ER $\beta$ 2-F/R)分别扩增ER- $\beta$ 1和ER- $\beta$ 2中间片段。PCR扩增在PTC-200型仪器上进行(BIO-RAD)。PCR反应体系总体积为25  $\mu$ L,含2.5  $\mu$ L 10 $\times$ 反应缓冲液,2  $\mu$ mol/L MgCl<sub>2</sub>,200  $\mu$ mol/L dNTP,引物各0.4  $\mu$ mol/L,1.0 U *Taq*酶,模板1.0  $\mu$ L。PCR反应程序为94  $^{\circ}$ C预变性3 min,然后进入30个循环:94  $^{\circ}$ C变性30 s,50  $^{\circ}$ C退火30 s,72  $^{\circ}$ C延伸90 s;最后72  $^{\circ}$ C延伸10 min。PCR产物用1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测,胶回收纯化后与

pMDT-19连接,连接产物转化感受态细胞DH5 $\alpha$ 。筛选阳性克隆并送上海生工生物工程技术有限公司测序。根据测出的序列设计特异的3'RACE(ER $\beta$ 1: ER $\beta$ 1-F1和ER $\beta$ 1-F2; ER $\beta$ 2: ER $\beta$ 2-F1和ER $\beta$ 2-F2)和5'RACE引物(ER $\beta$ 1: ER $\beta$ 1-R1和ER $\beta$ 1-R2; ER $\beta$ 2: ER $\beta$ 2-R1和ER $\beta$ 2-R2)。按照3' Full RACE Core Set Ver. 2.0和SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit说明分别扩增ER $\beta$ 1和ER $\beta$ 2的3'和5'端序列。PCR产物经纯化、连接和转化后测序,具体方法同上。

表1 奥利亚罗非鱼ER $\alpha$ / $\beta$  cDNA扩增及表达所用引物  
Tab.1 Primers for amplification of *O. aureus* ER $\alpha$ / $\beta$  cDNAs and real-time PCR

序号 sequence number	引物名称 primer name	引物序列 primer sequences
1	primer-F	ER $\beta$ 1-F: 5'CATCCCTCCTACCCTGTCTTA 3' ER $\beta$ 2-F: 5'TATTGACTGTTTGCGGGGACTT 3'
2	primer-R	ER $\beta$ 1-R: 5'TCCAGGTATTTGAAGGTCCGC 3' ER $\beta$ 2-R: 5'GGATGTTGATGTTTGACTGCT 3'
3	5'RACE-R1	ER $\beta$ 1-R1: 5'CTTCTCAGGCGAGGAGGCAGCG 3' ER $\beta$ 2-R1: 5'GGTCTGTIACACTGGGAACGATC 3'
4	5'RACE-R2	ER $\beta$ 1-R2: 5'TTACTTTGCTTTCTGCTCGGCG 3' ER $\beta$ 2-R2: 5'CACTTCACGAACTTGTCACGGG 3'
5	3'RACE-F1	ER $\beta$ 1-F1: 5'GAATCTTGAT AAGCTCGTGCCACCGC 3' ER $\beta$ 2-F1: 5'AACAAGCCGCTGCGTCTC 3'
6	3'RACE-F2	ER $\beta$ 1-F2: 5'CGATGGTTTCTGCTTCCTGACTGG 3' ER $\beta$ 2-F2: 5'TCTCCACATCCGGCACGTCAG 3'
7	T- $\beta$ -actin-F/R	F:5'-CAGCAAGCAGGAGTACGATGAG-3' R:5'-TGIGTGGTGTGIGGATGTTT-3'
8	T-ER $\beta$ 1-F/R	F:5' TGCTTCAGGCTACCACTATG 3' R:5'CTCTTACGGCGTTCCTGTC 3'
9	T-ER $\beta$ 2-F/R	F:5'CAGGTCAGAGTTTGGTAAGG 3' R:5'ATGGTTGAGTGGTGCGTGTG 3'
10	T-ER $\alpha$ -F/R	F:5'-TGCCACGCGACAAATCAG-3' R:5'-CATCATGAACACTTCGTAGC-3'

#### 1.4 序列分析

分别应用Vector NTI 8.0和Clustal W软件进行序列拼接、氨基酸序列推导及同源性分析。结合GenBank已收录的硬骨鱼类ER $\alpha$ / $\beta$ 1/ $\beta$ 2/ $\gamma$ 蛋白氨基酸序列,使用MEGA 4.0软件,通过邻位相连法(Neighbor-Joining, NJ)对11种硬骨鱼类进行了分子进化树聚类分析,其中以人(*Homo sapiens*) ER $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ 1/ $\gamma$ 2序列为外群,空位信息视为碱基缺失,自展检验(bootstrap analysis)设为1 000次。

#### 1.5 雌激素受体 $\beta$ 1/ $\beta$ 2基因在奥利亚罗非鱼组织的表达

双标准曲线的建立 取1~5  $\mu$ g奥利亚罗

非鱼总RNA,进行RT反应合成第一链。用特异引物对R- $\beta$ -actin-F/R, R-ER $\beta$ 1-F/R与R-ER $\beta$ 2-F/R分别扩增 $\beta$ -actin, ER $\beta$ 1和ER $\beta$ 2(表1),扩增片段大小分别为:136 bp,135 bp和121 bp。扩增产物胶回收后,分别克隆至T载体并转化到DH5 $\alpha$ 中。于37  $^{\circ}$ C 180 r/min摇床振荡过夜培养。用上述特异引物进行菌液PCR检测,阳性质粒送测序。测定阳性重组质粒的OD值,计算浓度。将标准品重组质粒进行10倍系列稀释,共设5个浓度梯度。以系列稀释的质粒为模板在实时荧光定量PCR仪上扩增(ABI-7300)。20  $\mu$ L反应体系,含Power SYBR Green PCR Master Mix 10  $\mu$ L,上、下游引物(10  $\mu$ mol/mL)各0.4  $\mu$ L,重

组质粒 DNA 1.0  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 8.2  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 50  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 然后 40 个循环: 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 循环结束后获取溶解曲线分析 (65 ~ 95  $^{\circ}\text{C}$  范围内, 每 0.2  $^{\circ}\text{C}$  读板 1 次), 以确认特异性扩增。每个样品重复 3 次, 设置阴性对照。

**雌激素受体  $\beta_1/\beta_2$  的组织表达** 提取奥利亚罗非鱼下丘脑、垂体、肝脏、肾脏、肠、脾、胃、精巢、卵巢及鳃 10 种组织总 RNA。经 DNaseI 消化后反转录为 cDNA。用 T- $\beta$ -actin-F/R, T-ER $\beta_1$ -F/R, T-ER $\beta_2$ -F/R 3 对引物分别进行扩增。每次反应均设定由阴性对照 (ddH<sub>2</sub>O) 和上述 10 倍系列稀释的靶基因重组质粒标准品。每个反应设 3 个重复。20  $\mu\text{L}$  反应体系, 含 Power SYBR Green PCR Master Mix 10  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物 (10  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ) 各 0.4  $\mu\text{L}$ , 重组质粒 DNA 1.0  $\mu\text{L}$  或各组织 RNA 转录后的 cDNA 1.0  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 8.2  $\mu\text{L}$ ; 反应条件同上。根据各自的标准曲线, 由软件计算待测样本中 ER $\alpha$ , ER $\beta_1$  和 ER $\beta_2$  的含量。为消除标本处理、反转录和 PCR 反应差异, 分别以目的基因 (ER $\alpha/\beta_1/\beta_2$ ) 与内参基因  $\beta$ -actin 的比值分析比较目的基因在各组织中的表达情况。

### 1.6 外源雌激素对雄性奥利亚罗非鱼雌激素受体 ER $\alpha/\beta_1/\beta_2$ 基因的表达调控

注射 E<sub>2</sub> 24 h 后, 提取处理组奥利亚罗非鱼的脑、垂体和性腺 3 种组织的总 RNA。RNA 经 DNaseI 消化和反转录后, 分别用 T- $\beta$ -actin-F/R, T-ER $\beta_1$ -F/R, T-ER $\beta_2$ -F/R 和 T-ER $\alpha$ -F/R 四对引物进行扩增。其中, T- $\beta$ -actin-F/R, T-ER $\beta_1$ -F/R 和 T-ER $\beta_2$ -F/R 引物序列同组织分布分析, T-ER $\alpha$ -F/R 引物序列见表 1。ER $\alpha$  扩增片段大小为 95 bp。双标准曲线建立及组织表达分析方法同上。

### 1.7 组织表达数据分析

目的基因的相对表达量 (ER $\alpha$ , ER $\beta_1$ , ER $\beta_2/\beta$ -actin) 用平均值  $\pm$  标准误表示, 数据分析采用 SPSS 15.0 统计分析软件 Duncan 氏法进行多重比较,  $P < 0.05$  时为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 奥利亚罗非鱼 ER $\beta_1$ 和 ER $\beta_2$ cDNA 的克隆及序列分析

奥利亚罗非鱼 ER $\beta_1$  cDNA 的全长为 4 262

bp (GenBank accession NO.: EU862260)。其开放阅读框 (open reading fragment, ORF) 包含 1 674 个碱基序列, 共编码 557 个氨基酸, 预测蛋白质分子量为 62 ku。5'-UTR 和 3'-UTR 分别为 239 bp 和 2 349 bp。奥利亚罗非鱼 ER $\beta_1$  氨基酸序列与同属的尼罗罗非鱼和莫桑比克罗非鱼同源性分别高达 99.1% 和 98.9%; 与同属鲈形目的姁丽鱼 (*Haplochromis burtoni*)、黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*)、金头鲷 (*Sparus aurata*)、黄鲈 (*Perca flavescens*) 的同源性在 82.6% ~ 94.2% 之间, 高于与其它目鱼类的同源性 (48.9% ~ 79.8%)。与哺乳类小鼠、黑猩猩 (*Pan troglodytes*) 及人的同源性较低, 为 47.9% ~ 48.5%。

奥利亚罗非鱼 ER $\beta_2$  cDNA 的全长为 2 506 bp (GenBank accession NO.: EU862261), 包含 5' 非编码区 393 bp, 3' 非编码区 109 bp, 2 004 bp ORF, 编码 667 个氨基酸, 预测蛋白质分子量约为 74 ku。推测氨基酸序列与同属尼罗罗非鱼的同源性高达 98.7%, 与其他物种同源性由高到低依次为鲈形目的大口黑鲈 (81.8%) > 鲈形目的底鲈 (76.3%) > 鲈形目的虹鲮 (64.7%) > 鲤形目的斑马鱼 (55.0%) > 小鼠 (43.1%) > 人 (42.9%)。

### 2.2 奥利亚罗非鱼 ER $\beta_1$ 和 ER $\beta_2$ 的结构域与系统进化分析

与尼罗罗非鱼的雌激素受体和奥利亚罗非鱼雌激素  $\alpha$  受体相似, 奥利亚罗非鱼雌激素  $\beta$  受体同样具有核受体超家族的 6 个功能结构域。奥利亚罗非鱼雌激素  $\beta$  受体两种亚型 (ER $\beta_1/\beta_2$ ) 与雌激素  $\alpha$  受体 (ER $\alpha$ ) 开放读码框及各个功能结构域的相似性见表 2。氨基酸序列的多重比对 (图 1) 表明: 在奥利亚罗非鱼的 3 种 ERs 中, C 区 (DNA 结合区) 是最保守的功能结构域, D 区 (铰链区) 结构域保守性最低, A/B 区 (转录激活区) 次之。同一类受体的两个亚型具有较高的相似性, 如奥利亚罗非鱼 ER $\beta_1$  和 ER $\beta_2$  的 A/B 区的相似性高达 35.1%。在系统进化树中奥利亚罗非鱼 ER $\beta_1$  和 ER $\beta_2$  分别先与尼罗罗非鱼的 ER $\beta_1$  和 ER $\beta_2$  的聚类 (图 2)。

### 2.3 奥利亚罗非鱼雌激素 ER $\beta_1/\beta_2$ 基因的组织分布

采用优化后的条件进行实时 PCR, 分别获得内参  $\beta$ -actin、目的基因 ER $\alpha$ 、ER $\beta_1$  和 ER $\beta_2$  4 条

标准曲线。各标准曲线均具有较高的线性相关系数( $R^2 \geq 0.99$ )。各溶解曲线均具有单峰,说明具有良好的扩增特异性。

表2 奥利亚罗非鱼3种ERs相似度比较  
Tab.2 Identities among three estrogen receptors(ERs) of *Oreochromis aureus* %

结构域 domain	基因 gene	OaER $\alpha$	OaER $\beta$ 1	OaER $\beta$ 2
ORF	OaER $\alpha$	100		
	OaER $\beta$ 1	41.5	100	
	OaER $\beta$ 2	38.1	49.8	100
A/B domain	OaER $\alpha$	100		
	OaER $\beta$ 1	14.8	100	
	OaER $\beta$ 2	16.5	35.1	100
C domain	OaER $\alpha$	100		
	OaER $\beta$ 1	85.4	100	
	OaER $\beta$ 2	83.1	89.2	100
D domain	OaER $\alpha$	100		
	OaER $\beta$ 1	11.8	100	
	OaER $\beta$ 2	15.5	15.3	
E/F domain	OaER $\alpha$	100		
	OaER $\beta$ 1	47.6	100	
	OaER $\beta$ 2	41.9	48.1	100

奥利亚罗非鱼ER $\beta$ 1/ $\beta$ 2基因在所检测的10种组织中均有表达(图3)。ER $\beta$ 1基因在卵巢的表达量最高,精巢、肝脏、肾脏和肠组织次之,这些组织的表达量均显著高于其他组织( $P < 0.05$ )。各组织的表达量由高到低依次为卵巢 > 精巢 > 肝脏 > 肾脏 > 肠 > 胃 > 下丘脑 = 垂体 > 脾 > 鳃。ER $\beta$ 2基因在精巢、肝脏及肾脏组织的表达量比其它组织的高( $P < 0.05$ )。ER $\beta$ 1在卵巢、精巢、肠与下丘脑中的表达量显著高于ER $\beta$ 2,其中卵巢中ER $\beta$ 1的表达量是ER $\beta$ 2的164倍。

#### 2.4 外源雌激素对ER $\alpha$ / $\beta$ 1/ $\beta$ 2基因表达影响

雄性奥利亚罗非鱼腹腔注射雌二醇E<sub>2</sub> 24 h后,下丘脑ER $\alpha$ 和ER $\beta$ 1基因的表达均呈上调,其中ER $\alpha$ 的升高幅度最大,且存在剂量依赖效应。在E<sub>2</sub>高剂量组(注射浓度为7.5 mg/kg),下丘脑ER $\alpha$ 的表达量最高,与对照组存在显著性差异( $P < 0.05$ );下丘脑ER $\beta$ 2基因的表达则没有显著变化。垂体中3个基因的表达在中低E<sub>2</sub>剂量(2.5、5.0 mg/kg)组均下调,而在E<sub>2</sub>高剂量(7.5 mg/kg)组则均上升,其中ER $\alpha$ 的表达量显著升高( $P < 0.05$ )。精巢中,注射E<sub>2</sub>后只有ER $\beta$ 2基因的表达量升高,以中、高剂量组(5.0、7.5 mg/kg)的升幅最大( $P < 0.05$ ),而ER $\alpha$ / $\beta$ 1两个基因的表达量则没有明显变化。

### 3 讨论

本实验克隆到奥利亚罗非鱼雌激素受体两个 $\beta$ 亚型(ER $\beta$ 1和ER $\beta$ 2)全序列。氨基酸序列同源性分析显示这两个亚型序列的同源性较高(58.7%),与奥利亚罗非鱼ER $\alpha$ (GenBank accession no. CAA63774)的同源性则相对较低(分别为43.4%和40.5%)。奥利亚罗非鱼ER $\beta$ 1与同属尼罗罗非鱼同源性高达99.1%,与鲈形目其它鱼类的也具有较高同源性(82.6%~94.2%)。ER $\beta$ 2氨基酸序列与尼罗罗非鱼同源性为98.7%,与其它鱼类的同源性较低(55.0%~81.8%)。在根据已知雌激素受体的氨基酸序列构建的系统进化树中,ER $\alpha$ 和ER $\beta$ 分属二大类群,说明异型ER的亲缘关系较远。ER $\beta$ 两种亚型再分成 $\beta$ 1和 $\beta$ 2两支,奥利亚罗非鱼的ER $\beta$ 两种亚型分别先与尼罗罗非鱼的相应亚型聚类,然后与其它鲈形目鱼类聚类,最后再与鲤形目鱼类的聚合,系统进化树反映了物种的亲缘关系。

脊椎动物雌激素受体的分子结构相似,可分为A/B、C、D、E和F 6个功能区。位于氨基端的A/B区为转录激活区,该区域富含S和P氨基酸残基,S氨基酸残基磷酸化是激活分裂素原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)活性所必需,其中短肽位点(P-X(1,2)-S-P)为MAPK激酶作用的保守区域<sup>[21]</sup>。该位点存在于脊椎动物的ER $\alpha$ 及ER $\beta$ 的A/B区中<sup>[22]</sup>。E/F区为配体结合区,该区含有5个螺旋结构,负责受体基因与配体的结合,形成所谓的“活性复合物”,再与DNA结合部位结合,导致邻近的基因活化(或抑制),最终导致细胞的功能改变或引起细胞的生长与分化<sup>[2, 8, 23-25]</sup>。奥利亚罗非鱼雌激素ER $\beta$ 1/ $\beta$ 2的受体A/B区富含S和P氨基酸残基,也具有MAPK激酶作用位点(P-X(1,2)-S-P),此位点存在于多种脊椎物种中,但是在不同物种中该位点的位置不同。其中,奥利亚罗非鱼ER $\beta$ 1/ $\beta$ 2的MAPK激酶作用位点与金鱼和尼罗罗非鱼的ER $\beta$ 1也相近,但与金头鲷、鳗鲡(*Anguilla japonica*)、真鲷(*Pagrosomus major*)、爪蟾(*Xenopus laevis*)、鸡(*Gallus gallus*)、鹌鹑(*Coturnix coturnix*)、大鼠、小鼠及人等其他脊椎动物的位置不同。另外,奥利亚罗非鱼A/B区长度

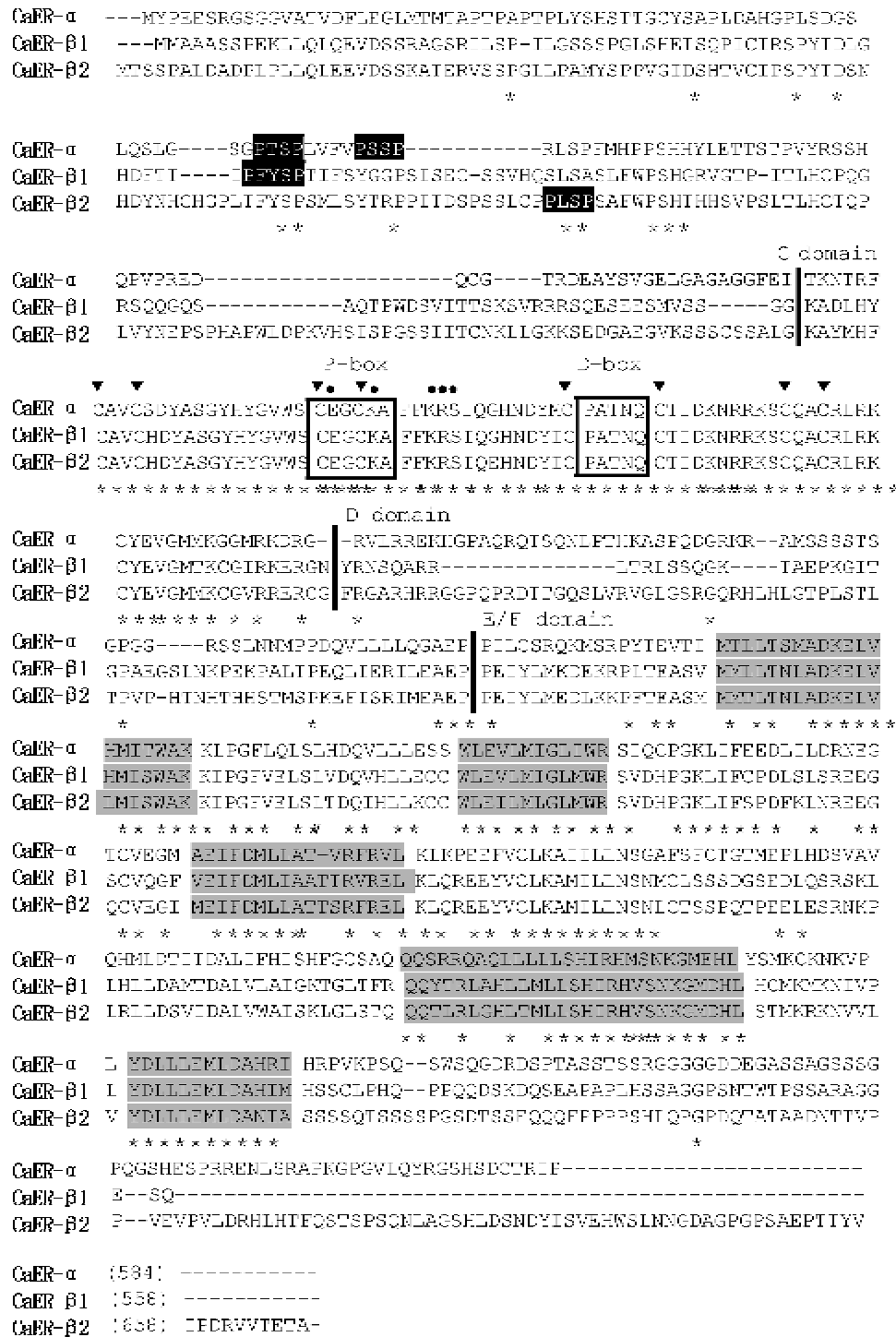


图1 奥利亚罗非鱼 ER $\alpha$ , ER $\beta$ 1 和 ER $\beta$ 2 的氨基酸序列比较

OaER- $\alpha$ , OaER- $\beta$ 1 和 OaER- $\beta$ 2 分别代表奥利亚罗非鱼 ER $\alpha$  (GenBank accession no. CAA63774), ER $\beta$ 1 和 ER $\beta$ 2; \* 示保守氨基酸残基; ▼ 示八个半胱氨酸参与 ER 锌指结构的组成; ● 示直接与靶基因上的 ERE 相互作用的氨基酸; 黑色阴影部分为潜在 MAPK 磷酸化位点; 灰色阴影部分为配体结构域内与结合雌激素关联的螺旋结构; 竖线示奥利亚罗非鱼 ERs 各保守的功能结构域分区

Fig.1 Multiple alignment analysis of three ERs amino acids from *Oreochromis aureus*

OaER- $\alpha$ , OaER- $\beta$ 1 and OaER- $\beta$ 2 represent *O. aureus* ER $\alpha$  (CAA63774), ER $\beta$ 1 and ER $\beta$ 2 respectively.

\* indicated conserved amino acids; ▼ denoted eight cysteine residues for construction of zinc finger motif;

● denoted amino acids interacting with estrogen receptor response element(ERE) in target gene; black shadows indicated the potential MAPK phosphorylation sites; grey shadows showed the helix structures of the ligand domain binding to estrogen; conserved functional domains of *O. aureus* ERs are fenced off by vertical lines

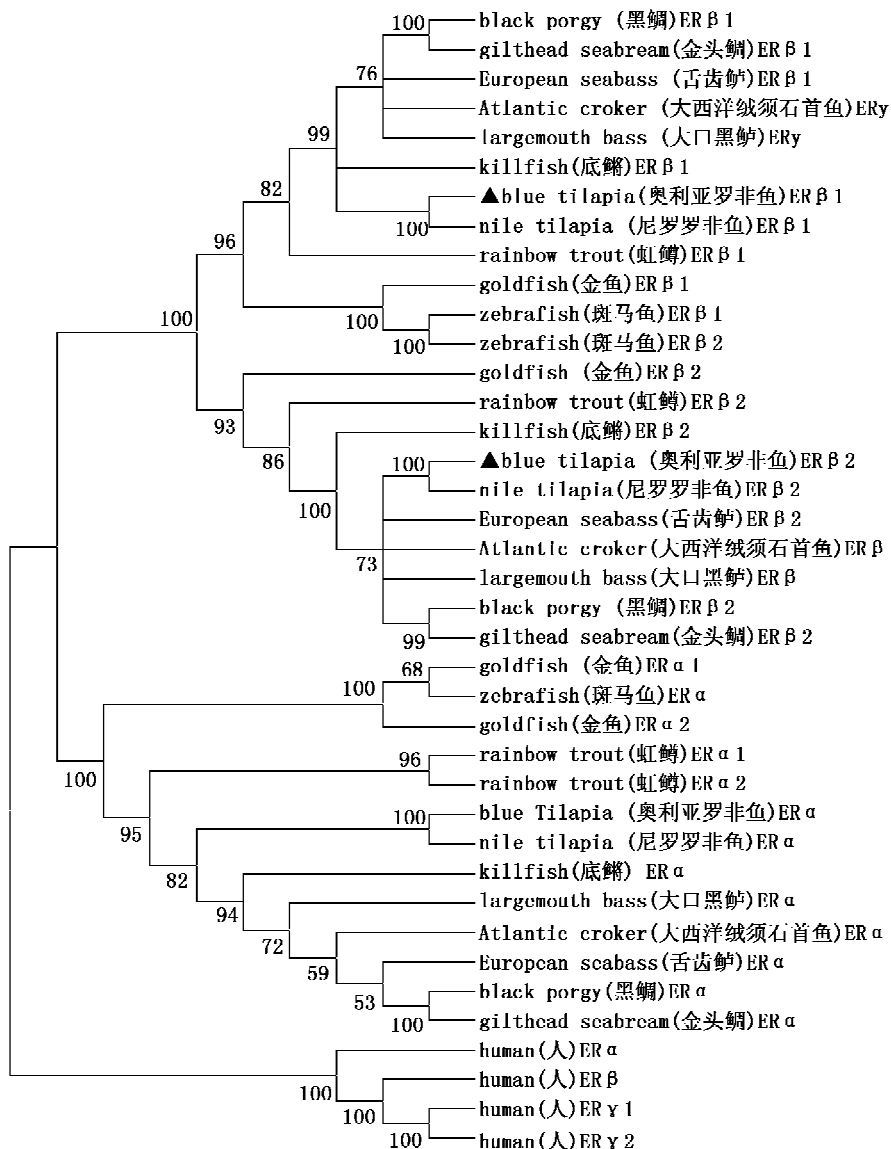


图2 基于 ERs cDNA 编码的氨基酸序列构建的系统进化树  
 奥利亚罗非鱼的 ER $\beta$ 1/ $\beta$ 2 用▲标出

Fig.2 Neighbor-Joining (NJ) tree constructed based on amino acid of estrogen receptors of teleosteans

ER $\beta$ 1/ $\beta$ 2 of *Oreochromis aureus* are marked with ▲

Accession nos. in GenBank: 黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*) ER $\alpha$ : AAL82743, ER $\beta$ : AAL82742, ER $\beta$ 2: ABY60988; 金头鲷 (*Sparus aurata*) ER $\alpha$ : CAB51479, ER $\beta$ 1: AAD31033, ER $\beta$ 2: CAE30470; 舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*) ER $\alpha$ : CAD43599, ER $\beta$ 1: CAD33851, ER $\beta$ 2: CAD33852; 大西洋绒须石首鱼 (*Micropogonias undulatus*) ER $\alpha$ : AAG16713, ER $\beta$ 1: AAG16711, ER $\beta$ 2: AAG16712; 大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) ER $\alpha$ : AAG44622, ER $\beta$ 1: AAO39210, ER $\beta$ 2: AAO39211; 底鳉 (*Fundulus heteroclitus*) ER $\alpha$ : AAT72914, ER $\beta$ 1: AAU44352, ER $\beta$ 2: AAT72914; 奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aureus*) ER $\alpha$ : CAA63774, ER $\beta$ 1: ACF75102, ER $\beta$ 2: ACF75103; 尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) ER $\alpha$ : Q9yh33, ER $\beta$ 1: Q9YH32, ER $\beta$ 2: ABE73151; 虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) ER $\alpha$ 1: P16058, ER $\alpha$ 2: ABA60432. 1, ER $\beta$ 1: ABA60433. 1, ER $\beta$ 2: ABB73309. 1; 金鱼 (*Carassius auratus*) ER $\alpha$ 1: AAL12298, ER $\alpha$ 2: AAR17610, ER $\beta$ 1: AAD26921, ER $\beta$ 2: AAF35170; 斑马鱼 (*Danio rerio*) ER $\alpha$ : AAK16740, ER $\beta$ 1: AAK16742, ER $\beta$ 2: CAC93849; 人 (*Homo sapiens*) ER $\alpha$ : P11474, ER $\beta$ 1: NP\_004443, ER $\gamma$ 1: NP\_001429, ER $\gamma$ 2: AAC99410

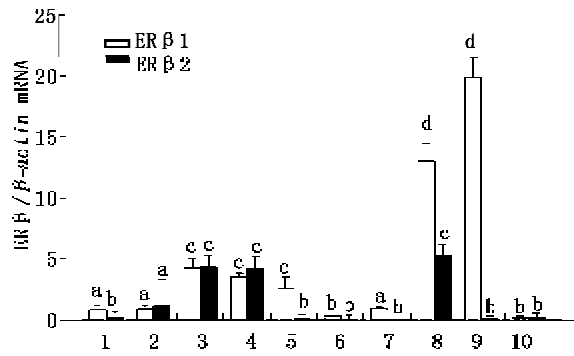


图3 奥利亚罗非鱼 ERβ1/β2 基因的相对表达量

1. 下丘脑; 2. 垂体; 3. 肝脏; 4. 肾脏; 5. 肠; 6. 脾; 7. 胃; 8. 精巢; 9. 卵巢; 10. 鳃

柱形图上不同字母代表存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )

Fig. 3 Relative expression levels of *Oreochromis aureus* ERβ1/β2

1. hypothalamus; 2. pituitary; 3. liver; 4. kidney; 5. midgut; 6. spleen; 7. stomach; 8. testis; 9. ovary; 10. gill

Different letter on the histogram means significant difference ( $P < 0.05$ )

和相似度在两两受体间变动较大,与金鱼,倒刺鲃,虹鳟等鱼类<sup>[7-9]</sup>一致。奥利亚罗非鱼雌激素 ERβ1/β2 的 C 区也含有与其它物种相同的八个保守的半胱氨酸残基、P-box 和 D-box 等元件。脊椎动物 E/F 区保守的 5 个螺旋结构同样存在于奥利亚罗非鱼 ERβ1/β2 的 E/F 区(图 1 中灰色部分)。保守氨基酸与重要结构域的存在提示奥利亚罗非鱼的雌激素受体 ERβ1/β2 应具有相似的生理功能。

ERβ1/β2 在所检测的奥利亚罗非鱼下丘脑、垂体 and 性腺等 10 种组织中均有表达。其中 ERβ1 在卵巢、精巢、肝脏、肾脏和肠等组织的表达量较高,以卵巢和精巢的表达量最高。研究显示,尼罗罗非鱼 ERβ1 表达量较高的组织有性腺、肠、肝脏和肾脏<sup>[13]</sup>;大口黑鲈 ERβ1 在性腺、肝脏和垂体组织表达量较高<sup>[12]</sup>;底鳉 ERβ1 在肝脏、脑、卵巢、精巢等组织有高表达<sup>[11]</sup>。奥利亚罗非鱼与上述几种鱼一样,ERβ1 均在性腺和肝脏组织中有较高的表达量。与 ERβ1 相似,底鳉、大口黑鲈和尼罗罗非鱼 ERβ2 同样在性腺与肝脏组织中高表达<sup>[11-13]</sup>。奥利亚罗非鱼的 ERβ2 主要在精巢、肝脏和肾脏中表达。已有研究显示雌激素受体表达的组织特异性与功能密切相关。性腺和肝脏雌激素受体与配体结合后,分别调控与生殖

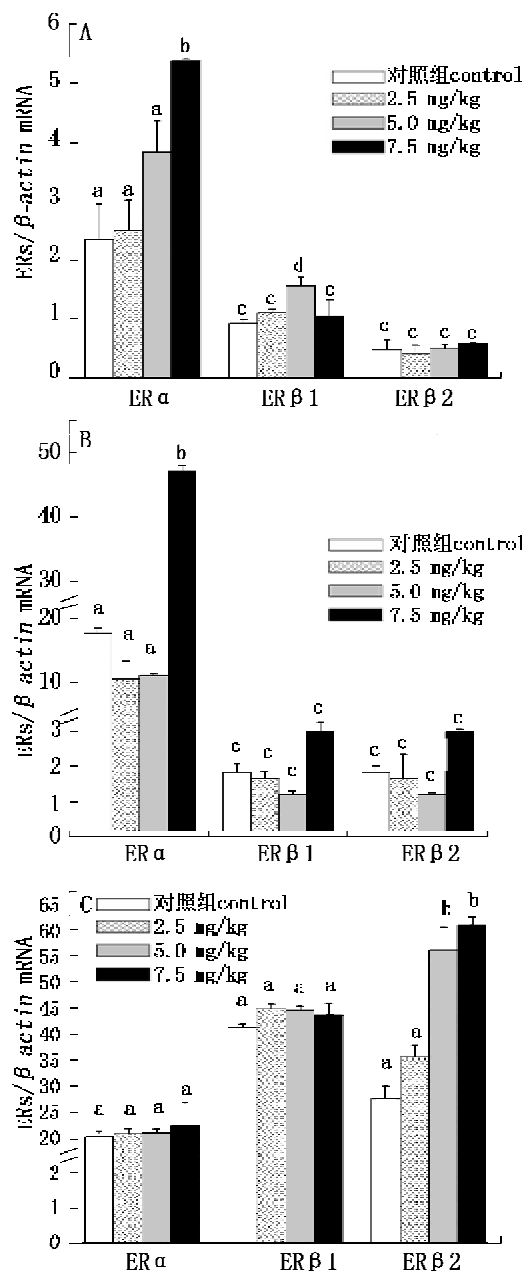


图4 注射雌二醇 24 h 后雄性奥利亚罗非鱼下丘脑、垂体和精巢 ERs 的相对表达量

A: 下丘脑; B: 垂体; C: 精巢

Fig. 4 Expression of ERs in hypothalamus, pituitary and testis of male *O. aureus* injected with 17β-estradiol

A: hypothalamus; B: pituitary; C: testis

相关的基因如促性腺激素受体等的表达和与卵黄蛋白原合成相关基因的表达,进而影响性腺组织的生长、发育及生殖周期的变化<sup>[8, 12, 16]</sup>;脑雌激素受体与雌激素结合后,可通过改变内分泌因子如促性腺激素等的表达调控生殖行为<sup>[12]</sup>。ERβ1/β2 在奥利亚罗非鱼的性腺与肝脏组织的



高表达显示它们也与生殖活动的调控密切相关。本研究还发现, ER $\beta$ 2 在奥利亚罗非鱼性腺表达中存在雌雄差异, 精巢组织 ER $\beta$ 2 表达量显著高于卵巢组织, 这与尼罗罗非鱼<sup>[13]</sup>、莫桑比克罗非鱼<sup>[17]</sup>的研究结果相似。推测奥利亚罗非鱼的 ER $\beta$ 2 对精巢精子细胞形成或成熟起重要作用。

关于外源雌激素对鱼类 ER 的表达调控近年已有相关报道。雄性黑头软口鲮经雌激素处理 14 d 后, 下丘脑与精巢的 ER $\alpha$  基因表达均显著上调, 垂体 ER $\beta$ 1 和精巢 ER $\beta$ 2 则显著降低 ( $P < 0.05$ )<sup>[26]</sup>。雄性金鱼埋植雌激素 7 d 后, 下丘脑与精巢的 ER $\alpha$  基因表达均升高, 下丘脑 ER $\beta$  则下降<sup>[27]</sup>; 注射雌激素 36 h 后, 雄性金鱼精巢 ER $\alpha$ / $\beta$ 1/ $\beta$ 2 基因均显著上调<sup>[28]</sup>。未成熟鲑鱼浸泡雌激素类似物 4-壬基苯酚 7 d 后, 脑 ER $\alpha$ / $\beta$  基因均显著上调 ( $P < 0.05$ )<sup>[29]</sup>。本研究中, 外源雌激素对雄性奥利亚罗非鱼下丘脑、垂体和精巢 3 个雌激素受体基因的表达也有不同的影响: 给予高剂量的雌激素, ER $\alpha$  基因在下丘脑、垂体的表达量显著上调, 而 ER $\beta$ 1 基因则仅在下丘脑、ER $\beta$ 2 仅在精巢的表达显著上调 ( $P < 0.05$ )。与黑头软口鲮、金鱼和鲑相似, 给予外源雌激素后奥利亚罗非鱼下丘脑 ER $\alpha$  基因的表达均上调。鱼类下丘脑是主要的信息处理中心, 它接收来自内外部信息并通过脑垂体将其转化为激素信号, 最终调节鱼类的发育、生长与繁殖<sup>[27]</sup>。在下丘脑中 ER $\alpha$  通过与配体结合调节促性腺激素等生殖内分泌相关基因的表达, 进而调节性腺的激素分泌与性腺发育<sup>[29]</sup>。雌二醇和其它的性类固醇类激素一样, 可通过正反馈或负反馈作用于下丘脑、垂体等区域, 调节相关激素的释放<sup>[30]</sup>。本研究中下丘脑 ER $\alpha$  基因的表达上调显示相应剂量对下丘脑产生了正反馈调控。在哺乳类, ER $\alpha$ / $\beta$  基因不同的表达谱以及通过小鼠基因敲除获得的不同表型显示它们具有不同的生理功能, 同时在雌激素信号通路上既有交叉又有独特的下游靶基因<sup>[31]</sup>。ER $\beta$  基因在不同鱼的下丘脑、垂体与精巢中的表达调控存在差异。鱼类不同组织中 ER $\alpha$ / $\beta$  基因对外源雌激素处理的差异表达调控方式反映了不同亚型的雌激素受体基因存在着组织特异性的生理功能。此外雌激素受体基因表达调控在鱼类间的差异也可能与物种、激素给予的方式、剂量以及处理时间等有关。综合本研究结果,

ER $\beta$ 1/ $\beta$ 2 的不同组织分布以及雌激素对下丘脑、垂体及性腺 ER $\alpha$ / $\beta$ 1/ $\beta$ 2 不同的表达调控, 提示奥利亚罗非鱼 3 种 ER 亚型存在着不同的生理功能。ER 各亚型的表达调控以及它们的生理功能尚待进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] 涂丽莉, 徐胜春. 雌激素受体- $\beta$  在中枢神经系统的分布及作用的研究进展[J]. 解剖学研究, 2004, 26(3): 222-225.
- [2] 刘春玲, 丁家桐, 王建武, 等. 雌激素受体的研究进展[J]. 动物科学与动物医学, 2003, 20(8): 35-36.
- [3] Kuiper G G, Enmark E, Peltö-Huikko M, *et al.* Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary[J]. Proc Natl Acad Sci, 1996, 93(12): 5925-5930.
- [4] Toft D, Gorski J. A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization[J]. Proc Natl Acad Sci, 1966, 55(6): 1574-1581.
- [5] Tremblay G B, Tremblay A, Copeland N G, *et al.* Cloning, chromosomal localization and functional analysis of the murine estrogen receptor  $\beta$ [J]. Mol Endocrinol, 1997, 11(3): 353-365.
- [6] Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER $\beta$ : identification and characterization of a novel human estrogen receptor[J]. FEBS Lett, 1996, 392: 49-53.
- [7] Ma C H, Dong K W, Yu K L. cDNA cloning and expression of a novel estrogen receptor  $\beta$  subtype in goldfish (*Carassius auratus*)[J]. Biochem Biophys Acta, 2000, 1490(1-2): 145-152.
- [8] Zhu P, Zhang Y, Zhuo Q, *et al.* Discovery of four estrogen receptors and their expression profiles during testis recrudescence in male *Spinibarbus denticulatus*[J]. Gene Comp Endocrinol, 2008, 156(2): 265-276.
- [9] Nagler J J, Cavileer T, Sullivan J, *et al.* The complete nuclear estrogen receptor family in the rainbow trout: discovery of the novel ER $\alpha$ 2 and both ER $\beta$  isoforms[J]. Gene, 2007, 392(1-2): 164-173.
- [10] Menuet A, Pellegrini E, Anglade I, *et al.* Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions[J]. Biol Reprod, 2002, 66(6): 1881-1892.

- [11] Greytak S R, Callard G V. Cloning of three estrogen receptors (ER) from killifish (*Fundulus heteroclitus*): differences in populations from polluted and reference environments [J]. *Gene Comp Endocrinol*, 2007, 150(1): 174–178.
- [12] Sabo A T, Kroll K J, Denslow N D. Differential expression of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) estrogen receptor isotypes alpha, beta, and gamma by estradiol [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 218(1–2): 107–118.
- [13] Wang D S, Senthilkumaran B, Sudhakumari C C, et al. Molecular cloning, gene expression and characterization of the third estrogen receptor of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. *Fish Physiol Biochem*, 2005, 31(2–3): 255–266.
- [14] Strobl-Mazzulla P H, Lethimonier C, Gueguen M M, et al. Brain aromatase (Cyp19A2) and estrogen receptors, in larvae and adult pejerrey fish *Odontesthes bonariensis*: neuroanatomical and functional relations [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2008, 158(2): 191–201.
- [15] Nes S, Andersen O. Temperature effects sex determination and ontogenetic gene expression of the aromatases cyp19a and cyp19b, and the estrogen receptors esr1 and esr2 in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) [J]. *Mol Reprod Dev*, 2006, 73(12): 1481–1490.
- [16] Filby A L, Tyler C R. Molecular characterization of estrogen receptors 1, 2a, and 2b and their tissue and ontogenic expression profiles in fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. *Biol Reprod*, 2005, 73(4): 648–662.
- [17] Davis L K, Pierce A L, Hiramatsu N, et al. Gender-specific expression of multiple estrogen receptors, growth hormone receptors, insulin-like growth factors and vitellogenins, and effects of 17 beta-estradiol in the male tilapia (*Oreochromis mossambicus*) [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2008, 156(3): 544–541.
- [18] Tsai C L, Chang S L, Wang L H, et al. Temperature influences the ontogenetic expression of aromatase and estrogen receptor mRNA in the developing tilapia (*Oreochromis mossambicus*) brain [J]. *Neuroendocrinol*, 2003, 15(1): 97–102.
- [19] 童金荷, 朱嘉濠, 关海山. 鱼类性别决定的遗传基础研究概况 [J]. *水产学报*, 2005, 29(3): 300–306.
- [20] Nguan S T, Toong J L, Jeak L D. The first contiguous estrogen receptor gene from a fish, *Oreochromis aureus*: evidence for multiple transcripts [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1996, 120(2): 177–192.
- [21] Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase [J]. *Science*, 1995, 270(5241): 1491–1494.
- [22] Socorro S, Power D M, Olsson P E, et al. Two estrogen receptor expressed in the teleost fish, *Sparus aurata*: cDNA cloning characterization and tissue distribution [J]. *J Endocrinol*, 2000, 166(2): 293–306.
- [23] 温海深, 董双林. 硬骨鱼类雌激素受体及其在生殖调节中的作用研究 [J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2008, 38(3): 367–370, 376.
- [24] Brzozowski A M, Pike A C, Dauter Z, et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the estrogen receptor [J]. *Nature*, 1997, 389: 753–758.
- [25] Pike A C, Brzozowski A M, Hubbard R E, et al. Structure of the ligand-binding domain of estrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist [J]. *EMBO J*, 1999, 18(17): 4608–4618.
- [26] Filby A L, Thorpe K L, Tyler C R. Multiple molecular effect pathways of an environmental oestrogen in fish [J]. *J Mol Endocrinol*, 2006, 37: 121–134.
- [27] Marlatt V L, Martyniuk C J, Zhang D, et al. Auto-regulation of estrogen receptor subtypes and gene expression profiling of 17 $\beta$ -estradiol action in the neuroendocrine axis of male goldfish [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2008, 283(1–2): 38–48.
- [28] Nelson E R, Wiehler W B, Cole W C, et al. Homologous regulation of estrogen receptor subtypes in gold fish (*Carassius auratus*) [J]. *Mol Reprod Dev*, 2007, 74(9): 1105–1112.
- [29] Meucci V, Arukwe A. Transcriptional modulation of brain and hepatic estrogen receptor and P450arom isotypes in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) after waterborne exposure to the xenoestrogen, 4-nonylphenol [J]. *Aquat Toxicol*, 2006, 77(2): 167–177.
- [30] Trudeau V L. Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus* [J]. *Rev Reprod*, 1997, 2(1): 55–68.

- [31] Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson J A. Nucl Recept Signal, 2008, 6: 2-10.  
Estrogen receptor  $\beta$ : an overview and update [J].

## Molecular cloning, tissue distribution of two estrogen receptor $\beta$ cDNAs of blue tilapia (*Oreochromis aureus*) and effects of estrogen on their expression

LAN Tao<sup>1,2</sup>, LU Mai-xin<sup>1\*</sup>, YANG Li-ping<sup>1</sup>, YE Xing<sup>1</sup>,  
ZHU Hua-ping<sup>1</sup>, GAO Feng-ying<sup>1</sup>, HUANG Zhang-han<sup>1</sup>

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China )

**Abstract:** Two sub-type estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ 1/ $\beta$ 2) cDNAs were obtained from blue tilapia, *Oreochromis aureus* by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and RACE. The full length cDNA sequence of ER $\beta$ 1 was 4 262 bp in length, containing a 5' Untranslated Regions (UTR) of 239 bp, 3' UTR of 2 349 bp and an open reading frame (ORF) of 1 674 bp which encoded a putative protein of 557 amino acids with an estimated molecular weight of 62 ku. The ER $\beta$ 2 cDNA was 2 506 bp in length with 393 bp of 5' UTR, 109 bp of 3' UTR and an ORF of 2 004 bp which encoded a putative protein of 668 amino acids with an estimated molecular weight of 74 ku. The deduced amino acid sequence of ER $\beta$ 1 of blue tilapia possessed 99.1% similarity with the counterpart of Nile tilapia, *O. niloticus*, and similarities with other Perciformes fishes were from 82.6% to 94.2%. The ER $\beta$ 2 amino acid sequences of blue tilapia shared 98.7%, 81.8%, 76.3%, 64.7% and 55.0% identities with Nile tilapia, *Micropterus salmoides*, *Oncorhynchus mykiss*, *Fundulus heteroclitus* and *Danio rerio* respectively. Blue tilapia ER $\beta$ 1/ $\beta$ 2 were clustered with Nile tilapia ER $\beta$ 1/ $\beta$ 2 respectively in the phylogenetic tree. ER $\beta$ 1/ $\beta$ 2 mRNA expressions between male and female were compared by Real-Time PCR (RT-PCR). ER $\beta$ s were expressed ubiquitously and differently in ten tested tissues. ER $\beta$ 1 was significantly expressed in ovary, testis, liver, kidney and intestinal tissues compared with other tissues ( $P < 0.05$ ). ER $\beta$ 2 was highly expressed in testis, liver and kidney ( $P < 0.05$ ). In ovary, testis, intestine and hypothalamus, expression of ER $\beta$ 1 was significantly higher than that of ER $\beta$ 2, and it was 164 times of ER $\beta$ 2 in ovaries. After 17 beta-estradiol ( $E_2$ ) was injected for 24 h, ER $\alpha$ / $\beta$ 1 mRNA in hypothalamus of male blue tilapia was increased, of which ER $\alpha$  increased significantly. Expression of ER $\alpha$  in hypothalamus increased significantly in 7.5 mg/kg  $E_2$  treated group, while no significant change was observed for ER $\beta$ 2. In pituitary, expression of ER $\alpha$ / $\beta$ 1/ $\beta$ 2 in the low and middle  $E_2$  concentrations (2.5, 5.0 mg/kg) was down-regulated, but up-regulated in high  $E_2$  concentration group (7.5 mg/kg), and significant difference was found for ER $\alpha$  ( $P < 0.05$ ). ER $\beta$ 2 expression was increased in testis significantly ( $P < 0.05$ ) in middle and high  $E_2$  concentration groups (5.0, 7.5 mg/kg). No significant change was observed for ER $\alpha$ / $\beta$ 1 expression. The different distribution of the ER $\beta$ 1/ $\beta$ 2 mRNAs and different regulation of ER $\alpha$ / $\beta$ 1/ $\beta$ 2 mRNA in hypothalamus, pituitary and testis by  $E_2$  indicated that various biological functions existed among these three ER subtypes in blue tilapia.  
**Key words:** *Oreochromis aureus*; estrogen receptor beta; ER $\beta$ 1 and ER $\beta$ 2; tissue distribution; expression regulation

**Corresponding author:** LU Mai-xin. E-mail: mx-lu@163.com