

doi: 10.3969/j. issn. 2095 - 0780. 2016. 01. 008

双棘黄姑鱼 *IGF3* 基因克隆及表达模式分析

林权卓¹, 陈奕彬¹, 胡娟¹, 王树启²,
杨宪宽¹, 沈卓坤³, 赵会宏¹

(1. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642; 2. 汕头大学广东省海洋生物技术重点实验室,
广东 汕头 515063; 3. 广东省海洋工程职业技术学校, 广东 广州 510320)

摘要: 以双棘黄姑鱼(*Protonibea diacanthus*)为实验对象, 通过 RACE 方法克隆得到 IGFs 家族成员 *IGF3*。双棘黄姑鱼 *IGF3* cDNA 全长 1 184 bp。氨基酸一致性分析显示, 双棘黄姑鱼 *IGF3* 与尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)一致性最高, 仅为 58.0%; 与自身 *IGF1* 的 2 个亚型及 *IGF2* 相比, 一致性分别低至 26.2%、25.2% 和 21.9%。系统进化树显示鱼类 *IGF3* 基因先与 *IGF2* 聚类, 再与 *IGF1* 汇聚构成 *IGF* 家族, 最后 *IGFs* 与胰岛素聚类。组织表达模式显示 *IGF3* 在双棘黄姑鱼心脏、性腺、脑区均有表达, 在性腺中表达最强。实时定量 PCR 结果表明, *IGF3* 在精巢发育期表达量显著高于其他时期, 呈显著下降趋势; 在卵巢成熟期的表达量显著高于其他时期。此外, 雌鱼在成熟期前、中、后脑 *IGF3* 的表达量显著高于其他时期, 而雄鱼各脑区 *IGF3* 表达趋势呈多样性。上述结果表明, *IGF3* 可能参与了双棘黄姑鱼精巢发育和卵巢成熟期生殖功能的调节, 且前脑可能主要参与了 *IGF3* 在性腺表达的反馈调节。

关键词: 双棘黄姑鱼; *IGF3*; 基因克隆; 表达模式

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

文章编号: 2095 - 0780 - (2016) 01 - 0050 - 09

IGF3* gene cloning and expression pattern of *Protonibea diacanthus

LIN Quanzhuo¹, CHEN Yibin¹, HU Juan¹, WANG Shuqi², YANG Xiankuan¹,
SHEN Zhuokun³, ZHAO Huihong¹

(1. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Guangdong Provincial Key Lab of Marine Biotechnology, Shantou University, Shantou 515063, China; 3. Guangdong Ocean Engineering Vocational and Technical School, Guangzhou 510320, China)

Abstract: We cloned *IGF3* gene from *Protonibea diacanthus* by RACE method. The length of cDNA was 1 184 bp. The homologous analysis of deduced protein shows that the identity of *IGF3* gene and *Oreochromis niloticus* was 58.0%. Compared with *IGF1* and two subtypes of *IGF2* of *P. diacanthus*, the identities were 21.9%, 26.2% and 25.2%, respectively. Phylogenetic tree analysis shows that *IGF3* tended to cluster with *IGF2* firstly and then cluster with *IGF1* composing *IGF* family, and finally *IGF* family clustered in the same branch with Insulin. Tissue distribution shows that *IGF3* was widely expressed in heart, gonad and brain of *P. diacanthus*, especially highest in gonad. Quantitative real-time PCR analysis reveals that the expression of *IGF3* in testis was significantly higher in developing phase than that in the others, showing a significant decline. The expression of *IGF3* in ovary of maturation phase was also remarkably higher than that in other periods. Besides, the expression of *IGF3* in forebrain, midbrain and hindbrain in female fish in mature phase was higher than that in other periods. However, *IGF3* expression pattern was different in male

收稿日期: 2014-12-02; 修回日期: 2015-03-17

资助项目: 国家科技基础平台建设项目(2004DKA30470-010); 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201303048); 广东省科技计划项目(2012B040400004); 广东省海洋生物技术重点实验室开放基金(GPKLMB201301); 广东省海洋渔业科技推广专项(A201201E04)

作者简介: 林权卓(1985-), 男, 硕士研究生, 从事水产生物技术研究。E-mail: 49846269@qq.com

通信作者: 赵会宏(1975-), 男, 副教授, 从事鱼类生理及水产动物种质资源开发利用研究。E-mail: zhaohh@scau.edu.cn

fish. It is suggested that IGF- might be important for the development of testis and maturation of ovary, and forebrain might involve in the feedback regulation of IGF- expression in gonad.

Key words: *Protonibea diacanthus*; insulin-like growth factor 3; gene clone; expression patterns

双棘黄姑鱼 (*Protonibea diacanthus*) 隶属鲈形目, 石首鱼科, 原黄姑鱼属, 俗称黑鮓、赤鮓, 是近海暖温性底层鱼类。主要分布于朝鲜、日本、东南亚及中国沿海, 是近年中国南方沿海新兴的养殖品种^[1]。

类胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGFs) 是一类进化上保守的多肽^[2]。具有合成代谢作用^[3-4], 能促进细胞的分裂和分化、抑制细胞凋亡^[5-6], 调控动物生长^[7-9]、生殖过程^[4, 10]等。IGF 家族包括 IGF 配体、IGF 受体 (insulin-like growth factor receptor, IGFR) 和 6 种 IGF 结合蛋白 (insulin-like growth factor binding protein, IGFBPs)^[11]。IGFs 由于与多种疾病有关, 已成为哺乳类研究的热点^[4-6, 12-15]。鱼类 IGFs 家族的研究相对滞后, 且更多倾向于 *IGF1* 和 *IGF2* 等相关基因和受体的研究^[16-19]。2008 年有学者在尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 和斑马鱼 (*Danio rerio*) 中发现性腺特异的 *IGF*, 将其命名为 *IGF3*^[20]。而后有研究发现, *IGF3* 在斑马鱼脑和咽弓部在不同时间都有不同程度的表达^[21]。*IGF3* 在生物体内能促进卵巢细胞的发育成熟和相关激素合成^[22], 增强细胞的增殖和迁移能力^[23], 缺乏则会导致生物体疾病的产生^[24-25]。最近有学者通过制备 *IGF3* 多克隆抗体和基因敲除等技术手段证明, *IGF3* 与性别分化相关转录因子及类固醇酶等相互作用, 影响罗非鱼生殖细胞的减数分裂^[26]。由于 *IGF3* 发现较晚, 一致性较低, 组织表达具有特异性, 为研究人员将 *IGF3* 扩展到其他物种研究带来不便。从 *IGF3* 被发现至今, 研究也仅限于罗非鱼、斑马鱼等一些物种, 虽然围绕 *IGF3* 研究的内容逐渐增多, 但还无法与 *IGF1* 和 *IGF2* 研究的深度与广度相比。文章以双棘黄姑鱼为实验对象, 通过 RACE 的方法成功克隆得到 *IGF3* 基因, 在生物信息学研究的基础上, 通过 *IGF3* 在性腺和脑区的表达模式分析, 研究 *IGF3* 在双棘黄姑鱼中的表达变化情况, 为在其功能和调节机制方面更深层次的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

双棘黄姑鱼采样于广东省饶平县养殖场, 体长 60 ~80 cm, 体质量 4 ~6 kg。表达实验鱼用碎冰麻醉后解剖, 依次分离前脑、中脑、后脑、垂体、肝脏、心脏、脾脏、肾脏、头肾、胃、肠、鳃、肌肉、性腺, 样品保存在冻存管中, 液氮速冻处理, 存放于 -80 超低温冰箱待用。

1.2 总 RNA 提取和反转录

总 RNA 参照 Trizol reagent (Invitrogen, USA) 说明书进行提取。参照 ReverTra Ace 反转录试剂盒 (TOYOBO, Japan) 说明书合成第一链 cDNA。以内参 18S 为引物, 进行 PCR 扩增, 验证反转录 cDNA 质量 (PCR 反应参数为预变性 94 3 min; 变性 94

30 s, 退火 53 20 s, 延伸 72 20 s, 循环次数: 25; 后延伸 10 min; 4 保存)。

1.3 双棘黄姑鱼 *IGF3* 引物设计与基因克隆

以反转录合成的第一链 cDNA 为模板, 根据已知的斑马鱼和尼罗罗非鱼 *IGF3* cDNA 序列设计中间片段引物, 扩增出双棘黄姑鱼 *IGF3* cDNA 部分片段。在此基础上, 设计 RACE 扩增引物 *IGF3-F2* (OUTER)、*IGF3-F3* (INNER)、*IGF3-R2* (OUTER)、*IGF3-R3* (INNER), 运用 RACE 技术, 分别克隆出 5 和 3 端序列。将序列拼接得到 *IGF3* 全长序列 (表 1)。

1.4 双棘黄姑鱼 *IGF3* 组织分布及表达

设计特异引物 *IGF3-QF* 和 *IGF3-QR* 检测双棘黄姑鱼 *IGF3* 在各个组织分布情况, 内参基因为 18S。PCR 反应所用试剂为 Blend Taq-plus (TOYOBO, Japan), 反应条件为 94 预变性 3 min; 94 变性 20 s, 55 退火 20 s, 72 延伸 1 min, 循环 30 次; 后延伸 10 min; 4 保存。检测的组织有肝脏、心脏、脾脏、肾脏、头肾、胃、肠、鳃、肌肉、性腺、垂体、前脑、中脑、后脑。运用实时定量 PCR 检测性腺中 *IGF3* 的表达模式。目标基因引物与组织分布引物相同, 内参基因选择双棘黄姑鱼 18S 基因。运用 Applied Biosystems 软件计算性腺发育各时期 *IGF3* 相对表达量; 使用 Graphpad Prism

表 1 双棘黄姑鱼 *IGF3* cDNA 克隆引物表Tab. 1 Primer pairs used for amplification of *IGF3* of *P. diacanthus*

引物 primer	引物序列(5' 3') primer sequences	扩增目标 amplification target
IGF3-F1	GTGGTCTGGTTATGGCACTC	cDNA fragment of IGF3
IGF3-R1	CACAGTACAATGTCCAATGCTG	cDNA fragment of IGF3
IGF3-F2(OUTER)	GTGTTGTGTGTTGGATGTG	3' RACE of IGF3
IGF3-F3(INNER)	CTGTGGTACTGACCTCCTCA	3' RACE of IGF3
IGF3-R2(OUTER)	GCAGCACTGGTCTACAATCC	5' RACE of IGF3
IGF3-R3(OUTER)	GAGTGCCATAACCAGACCAC	5' RACE of IGF3
IGF3-F	CAGGATGCACTCCTCATGCT	ORF of IGF3
IGF3-R	TAAAGGTATGATTAGAGC	ORF of IGF3
IGF3-QF	CAGGATGCACTCCTCATGCT	Expression of IGF3
IGF3-QR	CTGTGGTTGCTGCTGGCTC	Expression of IGF3
18S-F	CCTGAGAACGGCTACCACATCC	Expression of 18s rRNA
18S-R	AGCAACTTAGTATACGCTATTGGAG	Expression of 18s rRNA

软件中的 One-Way Analysis of Variance 进行显著性检验的统计学分析。

2 结果

2.1 IGF3 基因克隆及序列分析

设计全长验证引物 IGF3-F、IGF3-R(表 1)，通过 RACE PCR 技术扩增得到双棘黄姑鱼全长片段。双棘黄姑鱼 IGF3 cDNA 全长 1 184 bp。其中 5' 非编码区(UTR) 14 bp；开放阅读框(ORF) 600 bp，编码 199 个氨基酸；3' UTR 570 bp。IGF3 也可以划分为前体信号肽、B、C、A、D、E 区。但 IGF3 的 D 区与 E 区在氨基酸序列处没有明显的划分标志(图 1)。

2.2 IGF3 氨基酸一致性比较

通过 Pairwise Alignment 进行氨基酸序列一致性比较发现，双棘黄姑鱼与尼罗罗非鱼和斑马鱼 IGF3 一致性在 34.5% ~ 58% 之间，而 IGF3 与 IGF1 和 IGF2 的一致性更低(21.9% ~ 26.2%)。

2.3 IGF3 系统进化树

使用 MEGA 4.0 构建 IGF3 NJ 系统进化树(图 2)。鱼类 IGF3 基因先与 IGF2 聚类，再与 IGF1 汇聚构成 IGF 家族，最后 IGFs 与胰岛素聚类。

2.4 IGF3 组织表达模式

结果显示，心脏、性腺、脑分区中检测到了 IGF3 mRNA 的表达(表 3)。性腺 IGF3 mRNA 的表达量明显高于其他组织。

1	CC	2
3	CAC ACA GAC AGG	47
	ATG CACTCC TCA TGC TGC CCT TCT GCC AGA CCG	
	M H S S C C P S A R P	10
48	CAG ACA CTG AAG GTG TTG TGT GTT CGG ATG TGT ATG TTG TAC TCC	92
11	Q T L K V L C V R M C M F Y S	25
	Signal peptide	
93	ACC ATG TGT CTG GCC GG CTG CCG CTC TCC TCA GAG GCA GCC AGG	137
26	T M C L A G W P L S S E A A R	40
138	CTC CGC TGT GGT ACT GAC CTC CTC AGT GAC CTC ATC TTT GTG TGT	182
41	L R C G T D L L S D L I F V C	55
	B domain	
183	GGA GAT CGT GGA ATC TAT TTA GGT AAA GGT ACG TGG TCT GGT TAT	227
56	G D R G I Y L G K G T W S G Y	70
228	GGT GCT CGG CCC AGA GGG AAG GGG ATT GT A GAC CAG TG C TG C CGG	272
71	G A R P R G K G I V D Q C C R	85
	C domain	
273	CCG TCC GGC TGC GAA CCT CAG CAT CTG GAG ATG TAC TGT GCT AAA	317
86	P S G C E L Q H L E M Y C A K	100
	A domain	
318	CCA AAG AGC CAG CAG CAA ACC ACAG CTC CAC CCA ACC ACA ACT GCA	362
101	P K S Q Q Q T T A H P T T T A	115
363	GAA TCT TAT ACC ACG ATG CAG CCA GAC ACG ACG CAG CAG TTC CGA	407
116	E S Y T T M Q P D T T Q Q F R	130
408	GCA GT A TTT CAG AAG AGA CTT GTG GAG CAC CTG GGA GCT CCC GAC	452
131	A V F Q K R L V E H L G A P D	145
453	AGT CCA AAG AGG GAA AAC TAT AGA AAG AAA ACA CAG CCT TCA AAT	497
146	S P K R E N Y R K K T Q P S N	160
498	CGA CGG AAA AAC AAA GTG TCA TCG TCA GGC AGG AGG ATA AAC TCA	542
161	R R K N K V S S S S G R R N N S	175
543	AAG AAC GCA ACT AGC ACG CCT CCG CCA GCC TCC AGG AGT CCC CTT	587
176	K N A T S T P P P A S R S P L	190
588	CAA ACA ACA AGG AGC TCT GAA TCA TGA CCT TTA ACC TTG TGA AAA	632
191	Q T T R S S E S *	
633	GCT GAA TAT TTA TAG TTT CTA GAT TGA ATT TGG CAA GTT TCA AAG	677
678	ACT GAT GCT GG C TAC AGT AAG ATG AAC TCA AAG AAA TTC TCG GCA	722
723	AAG TAG GGA TCA AGT TAA AGA ACG ACA GAA TTG GAG GGA AAG TTG	767
768	CCG GAT CAC ATA ACA CAC CCA CTG GCA GCC ATG TTG GAG GAA AAC	812
813	ACA GAA CAC TGT TGG ACT TTT GAG TAA TTT GTC CTA TTA TAA ATG	857
858	TCA CCG TGT ACA AGG TTT TCT TAC TTA TGG AAC CAG AAC CTG GTA	902
903	GTG CCG GTT TCA CTC CAG ATG TCT ATT AGC ACT GCA GCA ATG TAT	947
948	CAA ACA GAA GCT TCC AAT AAT CTG ACC TTT AGA TAT CCA ACA AGG	992
993	TTT TTT GTA CTC AGC TCCTCT TTG TGT TTC TGT ATT TAA AGC	1037

图 1 IGF3 基因序列及编码氨基酸序列

起始密码子和终止密码子用方框标出

Fig. 1 cDNA and deduced amino acid sequence of full-length of *P. diacanthus* IGF3

The start codons and stop codons are marked with boxes.

表2 用于序列比对和系统进化树构建的 **IGF3** 氨基酸序列**Tab. 2 IGF3 amino acid sequences used for alignment and construction of phylogenetic tree**

物种 species	蛋白质 protein	登录号 GeneBank accession No.
尼罗罗非鱼(<i>O. niloticus</i>)	IGF3	ABY88870. 1
斑马鱼(<i>D. rerio</i>)	IGF3a	ADO16599. 1
斑马鱼(<i>D. rerio</i>)	IGF3b	ABY88869. 1
金鲷(<i>Sparus aurata</i>)	Insulin	ADV90806. 1
热带爪蟾(<i>Xenopus tropicalis</i>)	Insulin	NP_001093706. 1
斑马鱼(<i>D. rerio</i>)	Insulin	CAC20109. 1
人(<i>Homo sapiens</i>)	Insulin	AAP36446. 1
尼罗罗非鱼(<i>O. niloticus</i>)	Insulin	XP_003458727. 1
莫桑比克罗非鱼(<i>O. mossambicus</i>)	IGF1	AAB86652. 1
点带石斑鱼(<i>Epinephelus coioides</i>)	IGF1	AAS01183. 1
褐牙鲆(<i>Paralichthys olivaceus</i>)	IGF1	AAC62228. 1
虹鳟(<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	IGF1	NP_001118168. 1
黄鳍鲷(<i>Acanthopagrus latus</i>)	IGF1	AAT35826. 1
赤鲈(<i>Perca flavescens</i>)	IGF1	AAP93861. 1
眼斑拟石首鱼(<i>Sciaenops ocellatus</i>)	IGF1-Ea1	ADK38548. 1
眼斑拟石首鱼(<i>S. ocellatus</i>)	IGF1-Ea2	GU175982
眼斑拟石首鱼(<i>S. ocellatus</i>)	IGF1-Ea3	ADM15566. 1
眼斑拟石首鱼(<i>S. ocellatus</i>)	IGF1-Ea4	GQ443297
斑马鱼(<i>D. rerio</i>)	IGF1	NP_571900. 1
鲮鱼(<i>Cinclus molitorella</i>)	IGF1	AAY21902. 1
斑点叉尾鮰(<i>Ictalurus punctatus</i>)	IGF1	NP_001187224. 1
牛(<i>Bos taurus</i>)	IGF1	NP_001071296. 1
羊(<i>Ovis aries</i>)	IGF1	AAA80534. 1
野猪(<i>Sus scrofa</i>)	IGF1	ABC88023. 1
人(<i>H. sapiens</i>)	IGF1	NP_000609. 1
鼠(<i>Mus musculus</i>)	IGF1	NP_001104745. 1
斑马鱼(<i>D. rerio</i>)	IGF2a	NP_571508. 1
斑马鱼(<i>D. rerio</i>)	IGF2b	NP_001001815. 1
虹鳟(<i>O. mykiss</i>)	IGF2	NP_001118169. 1
斑点叉尾鮰(<i>I. punctatus</i>)	IGF2	NP_001187128. 1
金鲷(<i>S. aurata</i>)	IGF2	ABQ52655. 1
尼罗罗非鱼(<i>O. niloticus</i>)	IGF2	ABY88873. 1
点带石斑鱼(<i>E. coioides</i>)	IGF2	AAS58520. 1
牛(<i>B. taurus</i>)	IGF2	ABD34310. 1
家鼠(<i>M. musculus</i>)	IGF2	NP_034644. 2
非洲爪蟾(<i>X. laevis</i>)	IGF2a	NP_001082128. 1
非洲爪蟾(<i>X. laevis</i>)	IGF2b	AAH72153. 1
人(<i>H. sapiens</i>)	IGF2	NP_001121070. 1
羊(<i>O. aries</i>)	IGF2	NP_001009311. 1

表3 双棘黄姑鱼与部分脊椎动物IGF3氨基酸序列一致性比较

Tab. 3 Pairwise comparison of amino acid sequences of *P. diacanthus* IGF3 with those of selected IGF3

种类 species	蛋白质 protein	氨基酸一致性 /% amino acid identity
尼罗罗非鱼(<i>O. niloticus</i>)	IGF3	58. 0
斑马鱼(<i>D. rerio</i>)	IGF3a	35. 4
斑马鱼(<i>D. rerio</i>)	IGF3b	34. 5
双棘黄姑鱼(<i>P. diacanthus</i>)	IGF1-Ea2	26. 2
双棘黄姑鱼(<i>P. diacanthus</i>)	IGF1-Ea4	25. 2
双棘黄姑鱼(<i>P. diacanthus</i>)	IGF2	21. 9

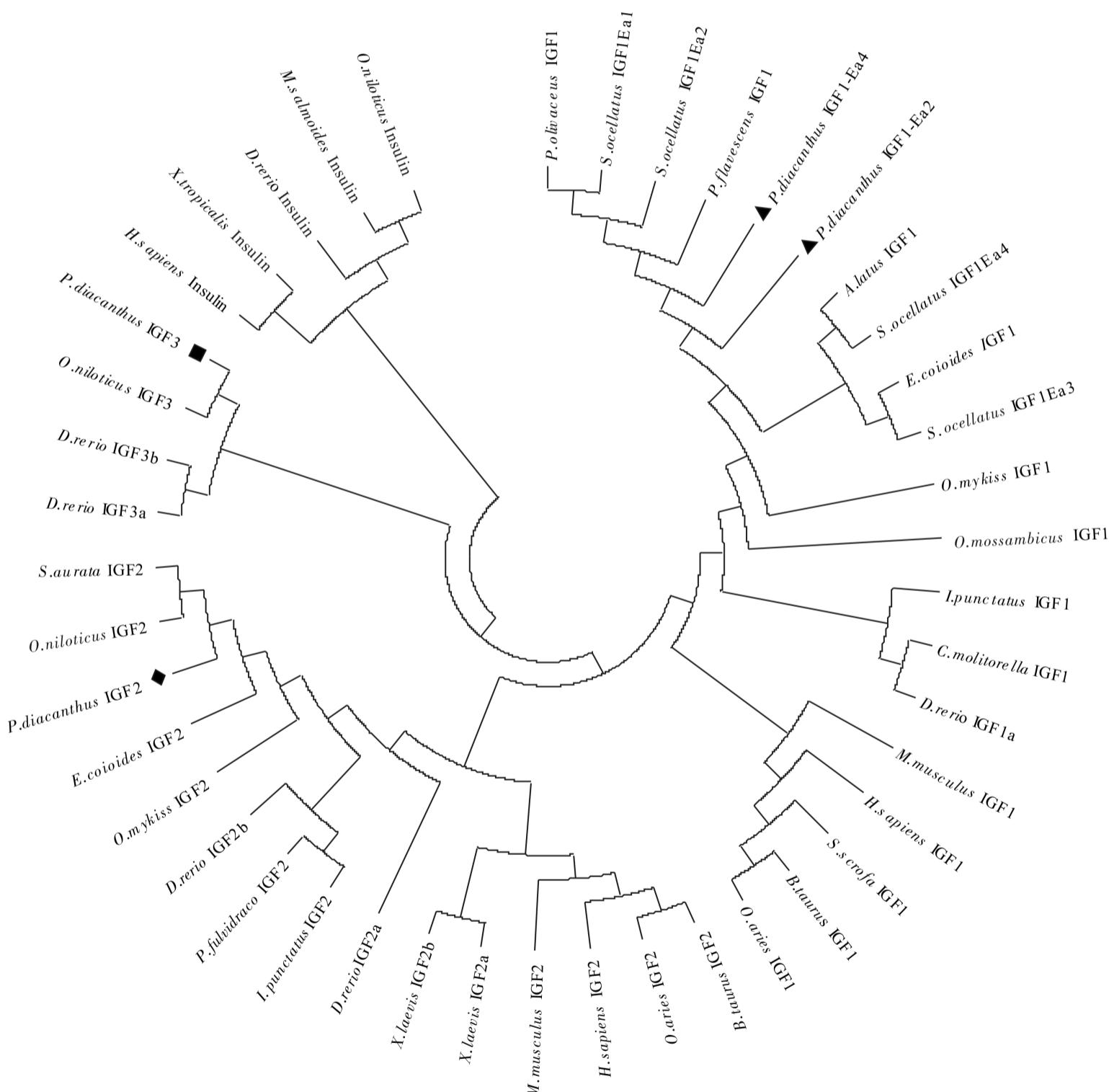


图 2 邻接法构建的 IGF3 系统进化树

Fig. 2 IGF3 Phylogenetic

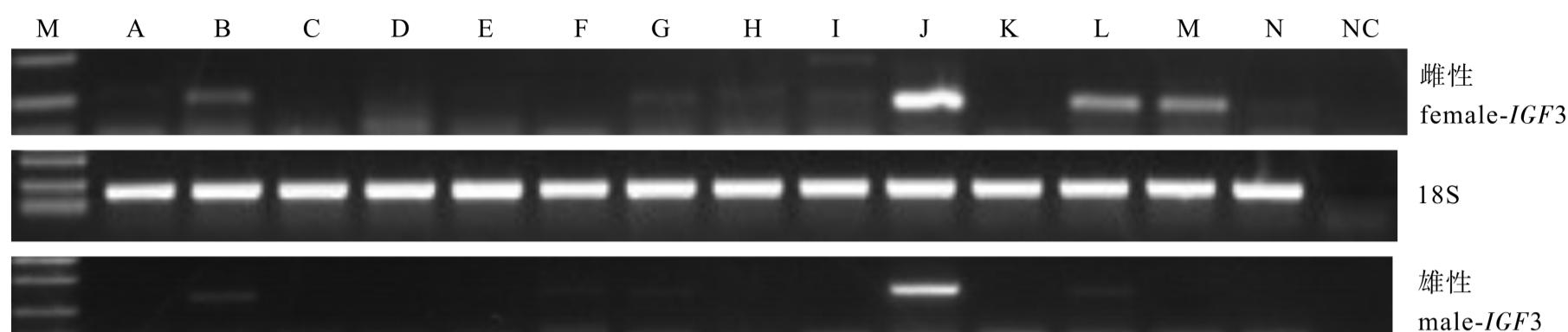
2.5 性腺发育各时期 *IGF3 mRNA* 的表达

石蜡切片确定双棘黄姑鱼所处的生殖时期分别为发育期、成熟期和退化期(图 4)。实时定量 PCR 分别检测了双棘黄姑鱼雌鱼和雄鱼在各时期 *IGF3*

mRNA 的表达量 (图 5)

2.6 性腺发育过程脑区 *IGF3* 的表达模式

双棘黄姑鱼雌鱼在生殖周期过程中, 前脑成熟期 *IGF3* mRNA 表达最高; 发育期至成熟期时 *IGF3*

图 3 *IGF3* 组织表达

M. marker; A. 肝脏; B. 心脏; C. 脾脏; D. 肾脏; E. 头肾; F. 胃; G. 肠; H. 鳃; I. 肌肉; J. 性腺;
K. 垂体; L. 前脑; M. 中脑; N. 后脑; NC. 阴性对照

Fig 3 Tissue distribution of *IGF3* in *P. diacanthus*

M. marker; A. liver; B. heart; C. spleen; D. kidney; E. head kidney; F. stomach; G. intestines; H. gill; I. muscle;
J. gonad; K. pituitary; L. forebrain; M. midbrain; N. after brain; NC. negative control

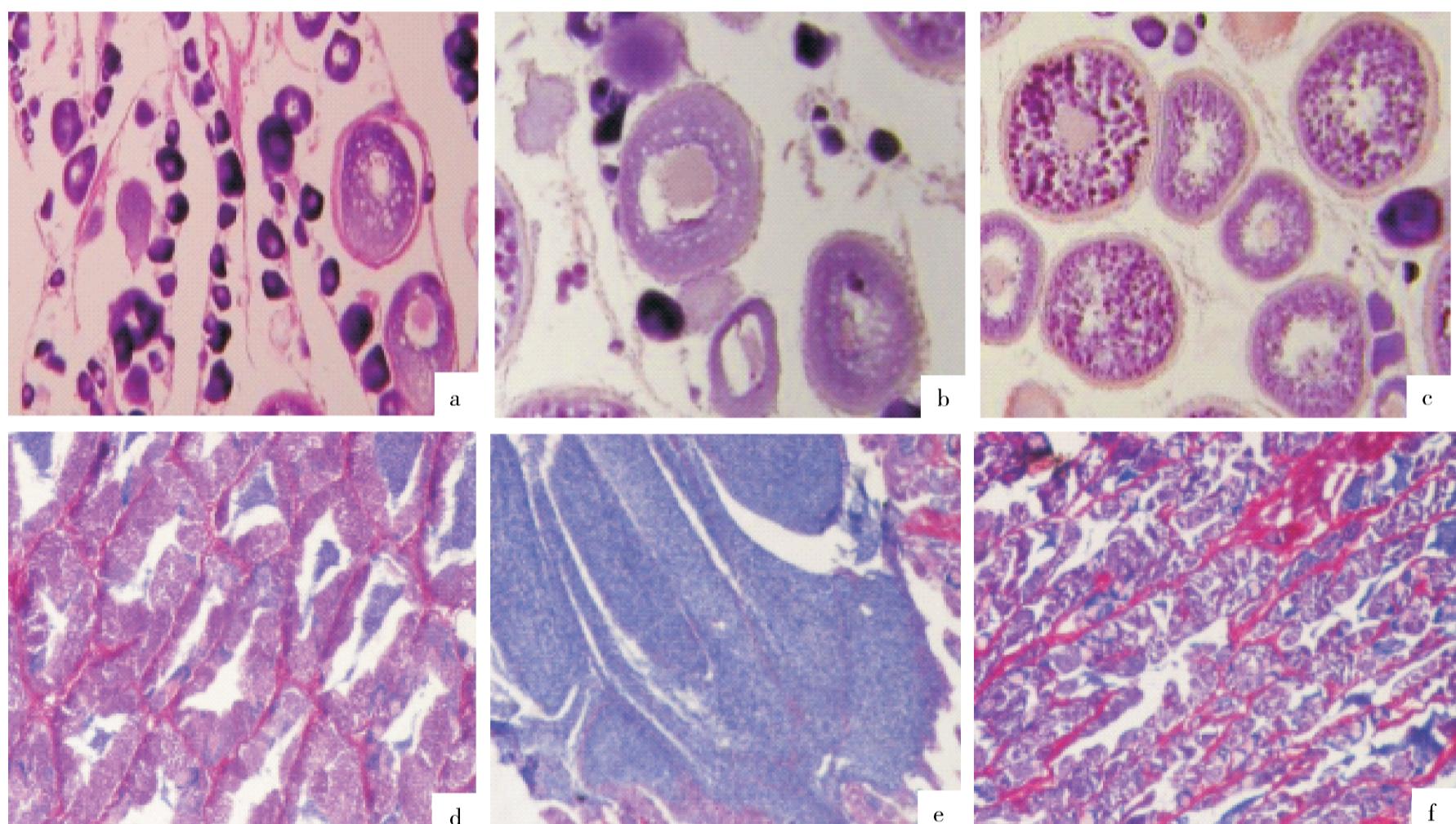


图 4 双棘黄姑性腺生殖周期组织切片

雌鱼: a 为发育期(期, $\times 60$); b 为成熟期(期, $\times 200$); c 为退化期(期, $\times 200$); 雄鱼: d 为发育期(期, $\times 100$); e 为成熟期(期, $\times 100$); f 为退化期(期, $\times 100$)

Fig 4 Gonadal histology sections of gonad development of *P. diacanthus*

Female: a. developmental phase; b. maturation phase; c. involutional phase; Male: d. developmental phase;
e. maturation phase; f. involutional phase

mRNA 表达量显著上升, 退化期显著下降; 雄鱼在生殖周期中, *IGF3* mRNA 表达量呈下降趋势, 发育期 *IGF3* mRNA 表达量最高, 至退化期时显著下降; 成熟期与退化期差异不显著(图 6 - a)。

生殖周期雌鱼中脑成熟期 *IGF3* mRNA 表达最高; 发育期至成熟期 *IGF3* mRNA 表达量显著升高, 至退化期显著下降。雄鱼 *IGF3* 表达趋势与雌鱼类

似(图 6 - b)。

双棘黄姑鱼雌鱼后脑 *IGF3* mRNA 表达趋势和前脑、中脑相似; 成熟期 *IGF3* mRNA 表达量最高、退化期最低, 但各时期 *IGF3* mRNA 表达量差异不显著。雄鱼后脑发育期检测不到 *IGF3* mRNA 信号, 成熟期和退化期有微弱的 *IGF3* mRNA 信号表达(图 6 - c)。

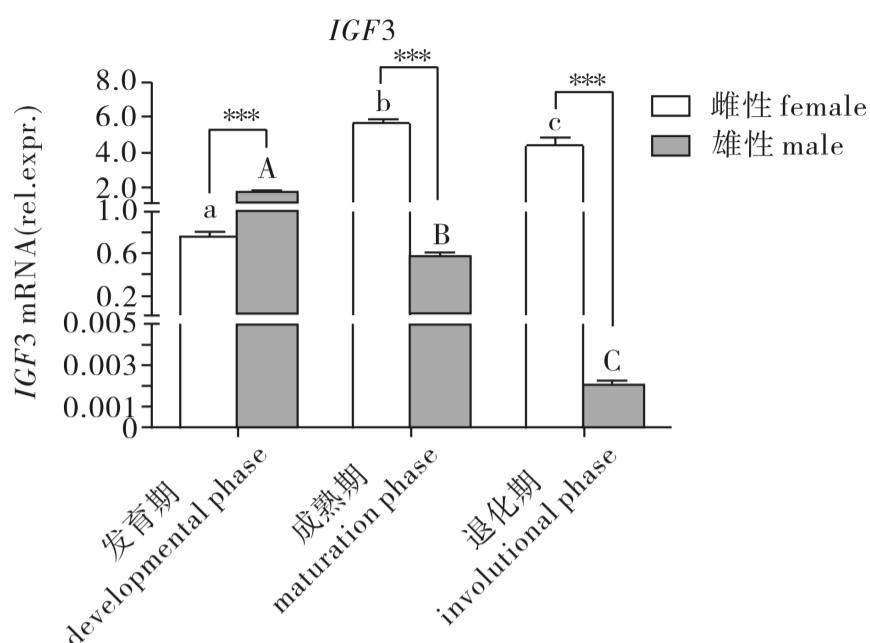


图 5 性腺发育周期双棘黄姑鱼性腺 *IGF3* 表达量的变化

不同小写字母表示雌鱼之间存在显著性差异 ($P < 0.005$)；

不同大写字母表示雄鱼之间存在显著性差异 ($P < 0.005$)。

所有数据均以平均值 \pm 标准误差；星号表示同时间内

雌雄表达量极显著，下图同此。

Fig. 5 *IGF3* expression level in gonad development of *P. diacanthus*

Different lowercase letters represent female significant difference ($P < 0.005$)； different uppercase letters represent the male significant differences ($P < 0.005$)； all data were expressed as $\bar{X} \pm \text{SE}$. Asterisks indicate the expression of male and female significantly in the same time. The same case in the following figure.

3 讨论

3.1 双棘黄姑鱼 ***IGF3*** 基因克隆与鉴定分析

有研究将斑马鱼、尼罗罗非鱼和青鳉 (*Oryzias latipes*) *IGF3* 与其他 IGFs 序列进行序列多重比对发现，*IGF3* 的 B 和 A 结构域与 *IGF-1* 的一致性只有 60%，C 和 D 为 30%，E 结构域通常是在形成成熟肽时被切除，一致性最低^[20]。参照现有文献，不能准确划分出双棘黄姑鱼 *IGF3* 氨基酸序列的 D

区和 E 区。硬骨鱼类 *IGF3* 氨基酸序列的结构划分，还需进一步研究确定。

氨基酸一致性分析，双棘黄姑鱼 *IGF3* 基因保守性较低。与尼罗罗非鱼 *IGF3* 和斑马鱼 2 种 *IGF3* 亚型一致性分别为 58.0%、35.4% 和 34.5%。不同物种间如此低的保守性，有无可能 *IGF3* 是 *IGF2* 的亚型？一致性分析显示双棘黄姑鱼 *IGF3* 与双棘黄姑鱼 *IGF2*、*IGF1-Ea2*、*IGF1-Ea4* 氨基酸序列一致性更低，分别为 21.9%、26.2% 和 25.2%。这揭示鱼类 *IGF3* 基因的进化分化可能早于 *IGF1* 和 *IGF2*。系统进化树结果显示，鱼类 *IGF3* 基因先与 *IGF2* 聚类，再与 *IGF1* 汇聚构成 *IGF* 家族，最后 *IGFs* 与胰岛素聚类，这更加佐证 *IGF3* 是 *IGFs* 家族的新成员。然而 *IGF3* 遗传信息在生物进化史上丢失于哪个时期、哪个物种，仍需进一步研究。

3.2 双棘黄姑鱼 ***IGF3*** 组织表达模式分析

在双棘黄姑鱼性腺中克隆到 *IGF3*。*IGF3* 虽在性腺内优势表达但并非性腺特异性表达，其在脑分区及心脏中也有较高表达。这与 *IGF3* 在尼罗罗非鱼和斑马鱼性腺中特异性表达不同^[20]，预示着 *IGF3* 除对鱼类生殖细胞有影响外，在双棘黄姑鱼中还存在着其他未知的生物功能。

3.3 双棘黄姑鱼 ***IGF3*** 性腺发育表达模式分析

精巢 *IGF3* 表达量在发育期显著高于其他时期，且表达量呈显著下降趋势（图 5）。雌鱼卵巢 *IGF3* 表达量在成熟期显著高于发育期，发育期精巢 *IGF3* mRNA 表达量要显著高于卵巢；此外在成熟期及退化期，精巢 *IGF3* 表达量要显著低于同一时期的卵巢。这种变化预示着 *IGF3* 可能与双棘黄姑鱼雄性精巢精子的早期发生以及雌性卵巢卵子的成熟及卵巢功能的维持有关。

有研究显示斑马鱼 *IGF3* 表达情况与该研究

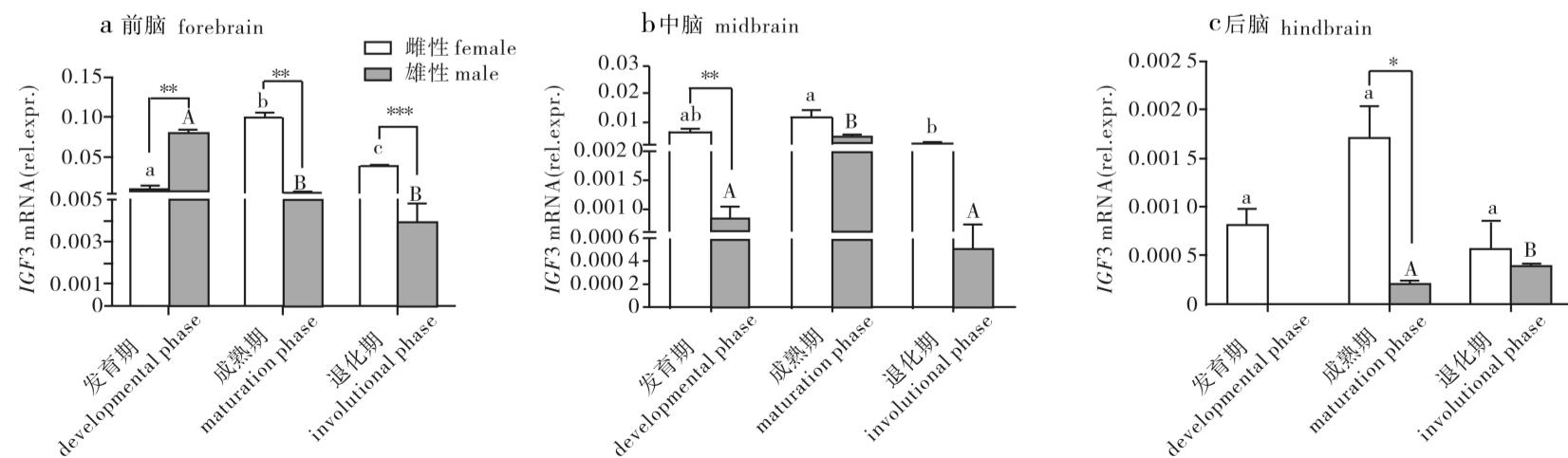


图 6 性腺发育阶段双棘黄姑鱼脑区 *IGF3* 表达量的变化

Fig. 6 *IGF3* expression of different regions of brain in gonad development phase of *P. diacanthus*

结果相似, *IGF3* 表达量随着卵泡的发育呈逐渐上升的趋势: *IGF3* 在发育前期微弱表达, 而在卵黄生成期时表达量显著增加, 至完全生长期时达到峰值^[27]。同样在尼罗罗非鱼性腺发育阶段中, *IGF3* 在雄性中高表达而在雌性中低表达^[28]。尼罗罗非鱼在个体发育早期便开始转录 *IGF3* mRNA, 原位杂交结果显示 *IGF3* mRNA 首先出现在卵巢的体细胞, 之后在卵巢的颗粒细胞及精巢的间质细胞检测到 *IGF3* mRNA 的表达^[20]; 在尼罗罗非鱼的早期性腺发育过程中, 受精卵在出膜后 5~40 d 卵巢 *IGF3* 表达量要高于精巢, 但在出膜 50 d 后精巢 *IGF3* 表达量高于卵巢, 后期卵巢 *IGF3* 表达量无明显变化, 而精巢中 *IGF3* 的表达量一直呈上升趋势^[29]。综合分析认为, *IGF3* 在不同时空下对不同物种的生殖细胞功能有所不同。

3.4 双棘黄姑鱼性腺发育各脑分区 ***IGF3*** 表达模式分析

硬骨鱼类的生殖活动是受脑-垂体-性腺轴调控的^[30]。脑能分泌神经肽、促性腺激素释放激素^[31]、GnIH^[32-33]、NKB^[34-35]等与生殖相关的激素和因子。在生殖周期中, 利用实时定量 PCR 在脑区检测 *IGF3* mRNA。雌鱼成熟期前、中和后脑 *IGF3* mRNA 表达量显著高于其他时期, 雄鱼各脑分区 *IGF3* mRNA 表达趋势具多样性。

4 小结

通过 RACE 方法首次在双棘黄姑鱼中克隆出 *IGF3* 基因, 并对其基因结构、氨基酸一致性、系统进化、性腺表达模式、脑区表达模式进行了系统性的分析。在性腺组织之外的心脏及脑区等也检测到 *IGF3* 的表达, 丰富了 *IGF* 家族在 *IGF3* 方面的信息。但 *IGF3* 在性腺发育中的具体功能以及发挥作用的机制如何、各脑区是如何控制下游信号的传导, 其反馈调节机制如何, 均是亟待解决的问题。

参考文献:

- [1] 胡珍华. 双棘黄姑鱼人工育苗技术 [J]. 河北渔业, 2013 (10): 46-48.
- [2] WOOD A W, DUAN C, BERN H A. Insulin-like growth factor signaling in fish [J]. Int Rev Cytol, 2005, 243: 215-285.
- [3] 徐爽, 赵玉岩, 沈扬, 等. 胰岛素抵抗肥胖大鼠血清增食欲素 A 与 *IGF-1* 及脂代谢相关性研究 [J]. 创伤与急危重病医学, 2014, 2(3): 179-182.
- [4] 郑洁莉, 徐莉. 多囊卵巢综合征中医证型与糖代谢及 *IGF-I*、*IGFBP-1* 相关性的研究 [J]. 世界中医药, 2014(7): 889-891.
- [5] 杨海燕, 侯建明, 吴曼, 等. 乳铁蛋白对大鼠成骨细胞增殖及 *IGF-1*/*IGF-1R* mRNA 表达的影响 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2014(1): 35-41.
- [6] 李士英. *IGF1R* 在骨肉瘤组织中的表达及临床意义 [D]. 苏州: 苏州大学, 2014: 2-3.
- [7] 王佩佩, 李晓存, 冷丽, 等. 鸡 *IGF-1R* 基因序列变异与骨骼、体重性状的相关研究 [J]. 中国家禽, 2014(11): 5-9.
- [8] 谢伟姣, 王敏, 于力, 等. *IGF-1R*、*IGFBP-1* 与妊娠期糖尿病巨大儿的相关性研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2014(10): 1508-1510.
- [9] 马强. *IGF-1* 基因对猪矮小性状的影响 [D]. 吉林: 吉林大学, 2014: 7.
- [10] 张磊, 王燕燕, 周占琴, 等. 摘除卵巢对布尔山羊杂种母羊组织 *IGF-I* 和 *IGF-1R* 基因表达的影响 [J]. 中国兽医学报, 2014(6): 1005-1011.
- [11] 杨慧荣, 赵会宏, 陈彦珍. 胰岛素样生长因子 *IGF* 系统与鱼类性腺的研究进展 [J]. 动物学杂志, 2013, 48(2): 306-313.
- [12] 田晓慧, 胡斌, 秦溶, 等. 血清 *IGF-1* 水平及癌组织 *VEGF* 表达在结肠癌患者诊断和治疗中的临床意义 [J]. 实用临床医药杂志, 2014(3): 9-11.
- [13] 徐文芹, 王雨生. *IGF-1*/*IGFBP-3* 在早产儿视网膜病变中的作用及其应用 [J]. 眼科新进展, 2014(9): 889-892.
- [14] 刘桂红. 2 型糖尿病易感基因 *TCF7L2*、*IGF2BP2* 多态性与汉族女性乳腺癌发病风险的关联研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2014: 30.
- [15] 谢伟姣. 胎盘中 *IGF-1*、*IGF-2*、*IGF-1R* 以及 *IGFBP-3* 表达水平与妊娠期糖尿病巨大儿的相关性研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2014: 6-7.
- [16] 钱焜, 温海深, 迟美丽, 等. 花鲈类胰岛素生长因子-1 基因的全长 cDNA 分离与表达分析 [J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2014, 44(2): 27-34.
- [17] 周春雪, 蒋霞云, 陈杰, 等. 草鱼胰岛素样生长因子 1 受体基因 cDNA 全序列的克隆及功能 [J]. 中国水产科学, 2014, 21(3): 442-453.
- [18] 钱焜, 温海深, 迟美丽, 等. 外源激素对花鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 血清 *IGF-1* 含量及肝脏 *IGF-1* 和 *IGFBP-1* mRNA 表达的影响 [J]. 渔业科学进展, 2014, 35(4): 39-44.
- [19] 张毅. 不同倍性鲫鲤 *GH/IGF-1* 轴相关因子的表达差异研究 [D]. 长沙: 湖南师范大学, 2014: 1-2.
- [20] WANG D S, JIAO B W, HU C J, et al. Discovery of a gonad-specific *IGF* subtype in teleost [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 367(2): 336-341.
- [21] LI J, WU P, LIU Y, et al. Temporal and spatial expression of the four *IGF* ligands and two *IGF* type 1 receptors in zebrafish during early embryonic development [J]. Gene Exp Patterns, 2014, 15(2): 104-111.
- [22] MAITRA S, DAS D, GHOSH P, et al. High cAMP attenuation of

- insulin-stimulated meiotic G2-M1 transition in zebrafish oocytes: interaction between the cAMP-dependent protein kinase (PKA) and the MAPK3/1 pathways [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 393(1/2): 109-119.
- [23] KOKAI L E, MARRA K, RUBIN J P. Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration [J]. *Transl Res*, 2014, 163(4): 399-408.
- [24] BAJKIN I, BIELICA A, ICIN T, et al. Effects of phthalic acid esters on fetal health [J]. *Medicinski Pregled*, 2014, 67(5/6): 172-175.
- [25] MORAVA E. Galactose supplementation in phosphoglucomutase-1 deficiency: review and outlook for a novel treatable CDG [J]. *Mol Genet Metab*, 2014, 112(4): 275-279.
- [26] 李明辉. 罗非鱼基因敲除技术的建立及其在性别决定与分化研究中的应用 [D]. 重庆: 西南大学, 2014: 93.
- [27] LI J Z, LIU Z H, WANG D S, et al. Insulin-like growth factor 3 is involved in oocyte maturation in zebrafish [J]. *Biol Reprod*, 2011, 84(3): 476-486.
- [28] BAROILLER J, D COTTA H, SHVED N, et al. Oestrogen and insulin-like growth factors during the reproduction and growth of the tilapia *Oreochromis niloticus* and their interactions [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2014, 205(SI): 142-150.
- [29] LI M H, WU F R, GU Y, et al. Insulin-like growth factor 3 regulates expression of genes encoding steroidogenic enzymes and key transcription factors in the Nile tilapia gonad [J]. *Biol Reprod*, 2012, 86(5): 163.
- [30] ZOHAR Y, MUÑOZ-CUETO J A, ELIZUR A, et al. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2010, 165(3 SI): 438-455.
- [31] OKA Y. Three types of gonadotropin-releasing hormone neurones and steroid-sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurones in teleosts [J]. *J Neuroendocrinol*, 2009, 21(4): 334-338.
- [32] KRIEGSFELD L J, MEI D F, BENTLEY G E, et al. Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(7): 2410-2415.
- [33] KRIEGSFELD L J. Driving reproduction: rfamide peptides behind the wheel [J]. *Horm Behav*, 2006, 50(5): 655-666.
- [34] CHENG G L, COOLEN L M, PADMANABHAN V, et al. The kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cell population of the arcuate nucleus: sex differences and effects of prenatal testosterone in sheep [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(1): 301-311.
- [35] KRAJEWSKI S J, BURKE M C, ANDERSON M J, et al. Forebrain projections of arcuate neurokinin B neurons demonstrated by anterograde tract-tracing and monosodium glutamate lesions in the rat [J]. *Neuroscience*, 2010, 166(2): 680-697.