

重组鲮 IGF- I 对鲮 GH 表达的影响

黄燕琴^{1,2}, 张殿昌¹, 苏天凤¹, 朱彩艳¹, 江世贵¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300; 2. 上海水产大学, 上海 200090)

摘要: 使用半定量 RT-PCR 方法检测了鲮各组织中 GH mRNA 的表达, 并分析重组鲮 IGF- I 处理后鲮 GH 表达变化情况。结果表明: 鲮的 GH mRNA 表达具有明显的组织特异性, 在鲮的肝、肾、脾、肌肉、肠、鳃、性腺、心脏和皮肤中都未检测到 GH mRNA 表达, 只在鲮脑中检测到 GH mRNA 表达; 经重组鲮 IGF- I 处理后, 鲮脑中 GH mRNA 稍有升高, 但在肝和肌肉中仍未检测到 GH mRNA 表达; 重组鲮 IGF- I 处理前后, 鲮血清中 GH 浓度变化不明显。

关键词: 鲮; 生长激素; 胰岛素样生长因子- I

中图分类号: Q522.2

文献标识码: A

文章编号: 1673-2227-(2006)05-0019-06

The effect of recombinant mud carp insulin-like growth factor- I (IGF- I) on expression of growth hormone (GH) in mud carp, *Cirrhinus molitorella*

HUANG Yanqin^{1,2}, ZHANG Dianchang¹, SU Tianfeng¹, ZHU Caiyan¹, JIANG Shigui¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;
2. Shanghai Fishery University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The study was conducted to examine the expression of GH mRNA in different tissues of mud carp by semi-quantitative RT-PCR and the effects of recombinant mud carp insulin-like growth factor- I (rmcIGF- I) on expression of GH in mud carp. GH mRNA detection result of brain of mud carp was positive, and the other tissues detections results were negative, including liver, kidney, spleen, muscle, intestine, gill, gonad, heart and skin. GH mRNA levels increased a little in brain in response to rmcIGF- I, but the treated fish exhibited no obvious change in sera GH concentration following rmcIGF- I injection.

Key words: mud carp; *Cirrhinus molitorella*; GH; IGF- I

在脊椎动物中, 生长激素 (growth hormone, GH) 和胰岛素样生长因子- I (insulin-like growth factor- I, IGF- I) 是 2 种重要的生长因子, 它们在动物的生长、发育、生殖和代谢调控中起重要作用。GH 是一种由单一肽链构成的非糖多肽激素,

由垂体前叶的生长激素细胞合成和分泌。GH 分泌活动受到脑特别是下丘脑产生的生长释放激素 (growth hormone releasing hormone, GHRH) 和生长激素释放抑制激素 (growth hormone release inhibiting hormone, GHRIH) 这 2 种激素的调控^[1]。鱼类

胰岛素样生长因子- I (IGF- I) 是一种由 70 个氨基酸组成的蛋白质, 其生物活性受 IGF- I 受体及 IGF- I 结合蛋白 (IGFBPs) 调节。肝脏是鱼类 IGF- I mRNA 的主要分泌表达位点, 但大部分肝外组织也有 IGF- I 的表达, 以旁分泌和自分泌的模式发挥作用^[24]。近年来国内外对鱼类的 GH/IGF- I 的分子调控及信号转导的机理进行了广泛的研究, 并取得了一定进展^[5-6], 而有关鱼类自身 GH 和 IGF- I 的相互影响研究甚少。

鱊 (*Cirrhinus molitorella*) 是我国南方主要淡水养殖鱼类之一, 在我国台湾、越南、菲律宾等国家和地区亦有养殖。为深入研究鱊 GH 的表达调控机理及 GH/IGF- I 的相互作用, 本研究在克隆鱊 GH 和 IGF- I cDNA 序列的基础上^[3,6], 首先检测了鱊 GH mRNA 组织表达, 并研究重组鱊 IGF- I 对其 GH mRNA 表达影响。

1 材料与方法

1.1 重组鱊 IGF- I

重组鱊 IGF- I 由本实验室参照 ZHANG 等^[7]的研究进行表达和纯化, 纯化后重组鱊 IGF- I 充分透析除盐, 冷冻干燥, 溶解在 0.7% 的生理盐水中待用。

1.2 实验动物处理以及组织的提取

将鱊 (500 ± 10 g) 从广州市番禺区鱼窝头镇养殖池塘中捕捞起后暂养于广东省鱊鱼原种场, 待其状态稳定后, 按鱼体重 120 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 注射重组鱊 IGF- I 或 0.7% 的生理盐水 (对照), 12 h 后取鱊脑、肝和肌肉保存于液氮中, 对照组取脑、肝、肌肉、肠、性腺、鳃、皮肤、脾脏、心脏和肾 10 种组织保存于液氮; 并从每条鱼中抽取血液 (大约 3 mL) 4℃ 冷凝 30 min, 4℃ 1500 g 离心 15 min, 取上清保存于 -20℃, 待检测 GH 和 IGF- I 含量^[8-9]。

1.3 总 RNA 的提取与 RT-PCR

按 Trizol Reagent (Invitrogen) 操作说明提取各组织总 RNA, 用 0.5 × TBE 配置 1% 琼脂糖凝胶, 取 2 μL 总 RNA 与 2 μL 2 × DEPC 处理后的加样缓冲液混合, 65℃ 加热 15 min 后, 立即于冰上放置 2 min, 加样电泳, 鉴定所提取总 RNA 的质量。取 2 μL 总 RNA 测定光密度 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值,

计算总 RNA 浓度。

进行 RT-PCR 前必需测 RNA 浓度, 逆转录体系对 RNA 量有一定要求, 本研究按逆转录试剂盒 TakaRa RNA LA PCRTM Kit (AMV) Ver 1.1 说明书要求, 所用总 RNA 量全部为 500 ng。

按逆转录试剂盒 TakaRa RNA LA PCR™ Kit (AMV) Ver. 1.1 方法进行逆转录: MgCl₂ 2 μL , 10 × RNA PCR 缓冲液 1 μL , DEPC 处理 H₂O 4.25 μL , dNTP 混合物 (各 10 mM) 1 μL , RNA 酶抑制剂 0.25 μL , AMV 逆转录酶 0.5 μL , Oligo (dT) 接头引物 0.5 μL , 总 RNA 0.5 μL (500 ng)。50℃ 45 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min, 一个循环。

1.4 PCR 循环数的确定及鱊 GH mRNA 组织表达

首先确定 PCR 扩增反应条件, 即确定 PCR 扩增反应循环数^[9]。用对照组肝 cDNA 作模板, 引物: Actin-F, Actin-R (表 1) (该引物特异性强), 94℃ 变性 30 s, 54℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 每 PCR 循环数为 15、20、25、30、35、40、45 取 4 μL , PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳 EB 染色分析。循环数确定后利用看家基因 (在鱊各组织中都表达) Actin 做内标, PCR 检测鱊 GH mRNA 各组织表达情况以及重组鱊 IGF- I 处理后 GH mRNA 在脑、肝和肌肉的表达, 所有 PCR 反应体系包括 1 μL (0.15 μg) cDNA, 0.25 μL rTaq 酶 (TaKaRa 公司), 正反向引物各 1 μL , 4 μL dNTP, 5 μL 10 × PCR 缓冲液, 双蒸水 37.75 μL , 总体积 50 μL 。PCR 反应均 94℃ 变性 5 min, 35 个循环 (94℃ 变性 30 s, 54℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s), 最后 72℃ 延伸 10 min。GH mRNA 检测引物序列见表 1。

表 1 扩增 GH、Actin 的引物序列

Tab. 1 Oligonucleotide primers used to amplify cDNA for mud carp GH and Actin

引物 primer	序列 sequence
Actin-F:	5'-GTGTTGGCG/ATACAGTCCTTACG-3'
Actin-R:	5'-CAGACTACCTC/GATGAAGATCCTGAC-3'
GH-F:	5'-ATGGAAAACCAGCGCCTCTTC-3'
GH-R:	5'-TGCATGTCCTCTTGAAGCAAG-3'

1.5 各组织 mRNA 表达检测结果分析

利用 GeneTools 软件分析, 计算出步骤 1.4 中所有 GH 和 Actin 条带的相对质量, 再将对应的 GH 与 Actin 质量相比, 得出 GH 的相对表达量。

1.6 GH 含量的检测

利用化学发光法 (德普 DPC) 测定血清中 GH 浓度, 利用放射性免疫法测定 (放射免疫计数器 SN679) 血清中 IGF- I 的含量^[8]。

2 结果

2.1 总 RNA 提取与 RT-PCR

从 100 mg 鱼组织中提取 RNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 可见清晰的 28S、18S 条带 (图 1), 表明总 RNA 完整性很好。根据测定 RNA 的 OD_{260} 和 OD_{280} 值, 计算其比值, 比值均在 1.9 ~ 2.0 之间, 也说明 RNA 纯度较高, 可用于后续反应。

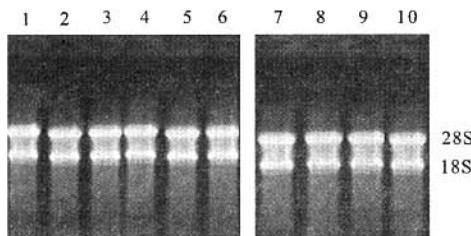


图 1 鱼组织总 RNA 1% 琼脂糖凝胶电泳

1. 脑; 2. 肝; 3. 肾; 4. 性腺; 5. 肠; 6. 鳃;
7. 脾脏; 8. 心脏; 9. 皮肤; 10. 肌肉

Fig. 1 1% agarose gel electrophoresis of total RNA from tissues of mud carp

1. brain; 2. liver; 3. kidney; 4. gonad; 5. intestine;
6. gill; 7. spleen; 8. heart; 9. skin; 10. muscle

2.2 PCR 循环数的确定

首先确定 PCR 反应条件, 通过鱼的分子内标 Actin 基因的相对表达量确定 PCR 扩增反应循环数, 用于检测鱼 GH mRNA 组织表达。由图 2 结果可知, PCR 循环数在 25 以下时, Actin 的扩增量较低, 电泳带不清晰; 循环数在 30 以上时结果较好, 循环数为 35 最为理想。

2.3 鱼 GH mRNA 组织表达与重组鱼 IGF- I 对鱼 GH mRNA 组织表达的影响

运用半定量 RT-PCR 方法只在脑组织中检测到

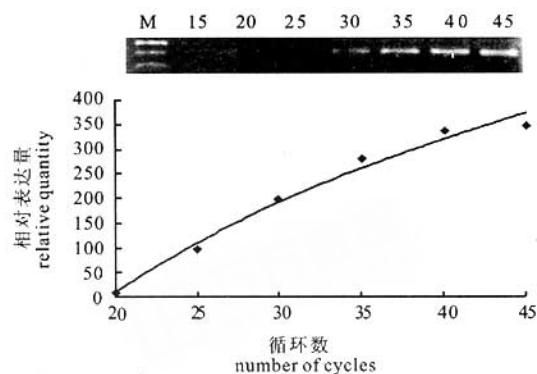


图 2 PCR 循环数对 Actin 基因扩增量的影响

M. 100 bp DNA 分子量标准; 15 ~ 45. 循环数分别为 15、20、25、30、35、40、45

Fig. 2 Effect of PCR cycle number on the amplification of Actin gene

M. 100 bp DNA marker; 15 ~ 45. Numbers on each lane represents the number of PCR cycles preformed

GH mRNA 表达, 而在鱼肝、肌肉、肾、皮肤、性腺、肠、鳃、心脏和脾组织都没有检测到 GH mRNA 表达; 按照鱼体重 $120 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 注射重组鱼 IGF- I, 12 h 后, 取肝脏、脑、肌肉, 用 Actin 作内标, 检测重组鱼 IGF- I 处理后鱼肝、脑、肌肉组织 GH mRNA 表达变化。经重组鱼 IGF- I 处理的鱼脑组织 GH mRNA 表达水平有所升高, 在鱼肌肉和肝脏组织中仍未检测到 GH 表达 (图 3)。

2.4 血清中 GH 的含量

利用化学发光法测定血清中 GH 的含量, 对照组中血清中 GH 的含量为 $0.037 \pm 0.0067 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 重组鱼 IGF- I 处理组中血清中 GH 的含量为 $0.04 \pm 0.0058 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 经 *t* 检验, 表明处理前后血清中 GH 含量不存在显著性差异; 利用放射性免疫法测定血清中 IGF- I 的含量, 对照组中血清中 IGF- I 的含量为 $145.59 \pm 21.84 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 重组鱼 IGF- I 处理组中血清中 IGF- I 的含量为 $302.16 \pm 29.24 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 经 *t* 检验, 表明处理后血清中 IGF- I 含量显著升高 (表 2)。

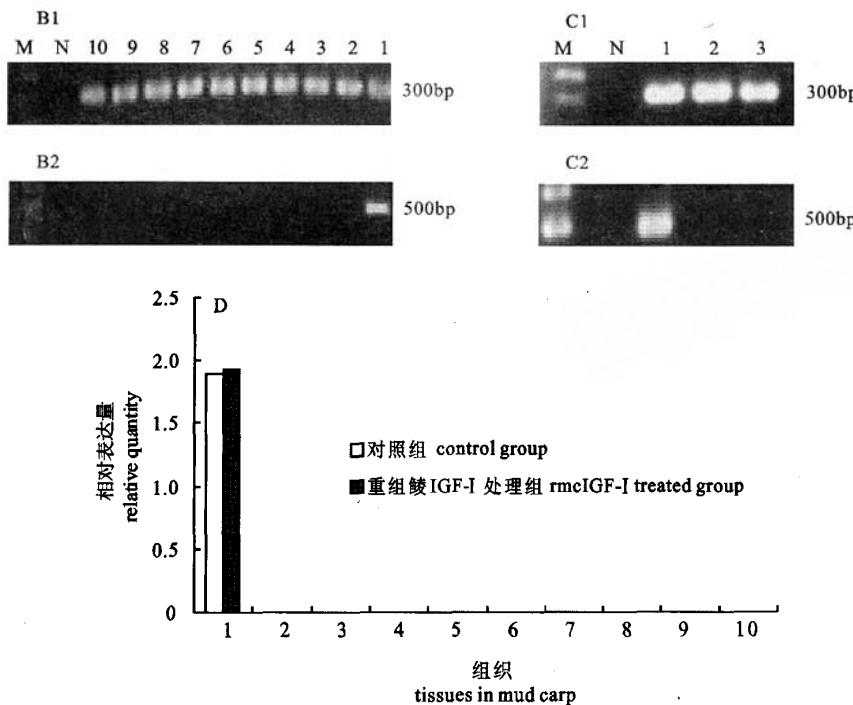


图3 半定量 RT-PCR 检测重组鲮 IGF- I 处理前后鲮组织组织 Actin 和 GH mRNA 的组织表达

B1. 半定量 RT-PCR 检测对照组中鲮组织 Actin mRNA 表达；B2. 半定量 RT-PCR 检测对照组中鲮组织 GH mRNA 表达；

C1. 半定量 RT-PCR 检测重组鲮 IGF- I 处理组中鲮组织 Actin mRNA 表达；C2. 半定量 RT-PCR 检测重组鲮 IGF- I 处理组中鲮组织 GH mRNA 表达；D. 鲮组织 GH mRNA 的相对表达量；M. 100 bp DNA 分子量标准；

N. 负对照（不加模板）；1~10. 脑，肝，肌肉，肾，肠，鳃，脾，性腺，心脏，皮肤

Fig. 3 Semi-quantitative RT-PCR analysis of expression of Actin and GH mRNA in various tissues in mud carp

B1. Actin mRNA detection in various tissues by semi-quantitative RT-PCR in control group；B2. GH mRNA detection in various tissues by

semi-quantitative RT-PCR in control group；C1. Actin mRNA detection in various tissues by semi-quantitative RT-PCR in rmclGF- I in treated group；C2. GH mRNA detection in various tissues by semi-quantitative RT-PCR in rmclGF- I in treated group；

D. relative quantity of GH mRNA in various tissues in mud carp；M. 100 bp DNA molecular weight Marker；

N. a negative control (no template)；1~10. brain, liver, muscle,

kidney, intestine, gill, spleen, gonad, heart, skin

表2 对照组和重组鲮 IGF- I 处理组鲮血清中 GH 和 IGF- I 浓度

Tab. 2 The GH and IGF- I concentration in sera in control and rmclGF- I treated fish

	浓度 \pm S. E. (n = 3) / ng·mL ⁻¹		P 值	
	control			
	rmclGF- I treated group			
生长激素含量 GH concentration	0.037 \pm 0.0067	0.04 \pm 0.0058	P = 1.000 > 0.05	
胰岛素样生长因子含量 IGF- I concentration	145.59 \pm 21.84	302.16 \pm 29.24	P = 0.013 < 0.053	

3 讨论

采用半定量 RT-PCR 方法对鱥 GH mRNA 的检测结果显示, 只在鱥脑组织中检测到 GH mRNA 表达, 而在鱥肝、肌肉、肾、皮肤、性腺、肠、鳃、心脏和脾组织中都未检测到 GH mRNA 表达; 经重组 mcIGF- I 处理, 脑组织中鱥 GH mRNA 表达水平有所升高, 而在鱥肌肉和肝脏中仍未检测到 GH mRNA 表达。由内标 Actin 在鱥各个组织中的表达量可以推断出, 在鱥肝、肌肉、肾、皮肤、性腺、肠、鳃、心脏和脾脏组织中没有检测到 GH mRNA 以及处理前后鱥脑 GH mRNA 表达的变化, 并不是因为从样品中抽提的 RNA 质量以及逆转录问题。重组 mcIGF- I 处理前后, 脑 GH mRNA 表达稍有升高, 可能是因为重组 mcIGF- I 在一定程度上刺激鱥脑分泌 GH。

在哺乳动物中的研究表明^[9-10], 人 IGF- I 对罗非鱼和虹鳟 GH 释放和表达都有抑制作用。LEEDOM 等^[11]利用重组牛生长激素 (recombinant bovine somatotropin, rbST) (120 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 鱼体重) 刺激罗非鱼, 经刺激的罗非鱼血清 GH 不变; BIGA 等^[12]利用同剂量 rbST 刺激虹鳟, 发现虹鳟性腺 GH mRNA 表达升高。MELAMED 等^[13]研究表明, 大麻哈鱼促性腺激素释放激素 (salmon gonadotropin-releasing hormone, sGnRH) 对罗非鱼 GH 的释放有促进作用, 但对其 GH mRNA 水平没有影响; LI 等^[1]研究发现, sGnRH 既促进草鱼 GH 的释放, 又刺激脑 GH mRNA 的表达。RILY 等^[14]发现经老鼠促生长激素释放激素 (ghrelin, GHN) 2 周处理, 罗非鱼垂体分泌的 GH 升高, 但其脑垂体 mRNA 水平却没有变化; UNNIAPPAN 和 PETER^[15]研究发现金鱼 GHN 可以促进其脑垂体 GH mRNA 的表达。由这些结论推断 GH 的表达和分泌可能与物种的特异性有关。PETEZ-SANCHEZ 等^[10]利用重组人 IGF- I 处理虹鳟, 发现重组人 IGF- I 对虹鳟 GH 的释放有抑制作用。本研究中重组鱥 IGF- I 对脑 GH mRNA 表达影响与文献报道的结论不尽一致, 这表明 GH 与 IGF- I 的表达、分泌机理及其相互作用远比我们目前所了解的情况复杂。

本实验中, 外源 IGF- I 的处理使鱥血清 GH 浓度变化不明显, 并且重组鱥 GH 对鱥血清中 GH 浓

度影响也不明显 (数据另文发表)。这些结果与 LEEDOM 等^[11]用重组牛生长激素处理罗非鱼, 内源 GH 变化不明显的结论一致。

参考文献:

- [1] LI Wensheng, LIN Haoran, WONG A O L. Effects of gonadotropin-releasing hormone on growth hormone secretion and gene expression in common carp pituitary [J]. Comp Biochem Physiol: Part B, 2002, 132 (2): 335-341.
- [2] LI Yinghua, BAI Junjie, JIAN Qing, et al. Expression of common carp growth hormone in the yeast *Pichia pastoris* and growth stimulation of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Aquac, 2003, 216 (1/4): 329-341.
- [3] 江世贵, 张殿昌, 苏天凤, 等. 鳥生长激素 cDNA 的分子克隆和序列分析 [J]. 中国水产科学, 2003, 10 (2): 97-101.
- [4] KOJI Inoue, HOZI Iwatani, YOSHIO Takei. Growth hormone and insulin-like growth factor I of a Euryhaline fish *Cottus kazika*: cDNA cloning and expression after seawater acclimation [J]. Genl Comp Endocrinol, 2003, 131 (1): 77-84.
- [5] LARA J I, LORENZO M J, TOLON C L, et al. Induction of vasoactive intestinal peptide gene expression and prolactin secretion by insulin-like growth factor I in rat pituitary cells: evidence for an autocrine regulatory system [J]. Endocrinol, 1994, 135 (6): 2526-2532.
- [6] 张殿昌, 江世贵, 苏天凤, 等. 鳥胰岛素生长因子 I (IGF-I) cDNA 的分子克隆和序列分析 [J]. 上海水产大学学报, 2002, 11 (2): 97-101.
- [7] ZHANG Dianchang, HUANG Yanqin, SHAO Yanqing, et al. Molecular cloning, recombinant expression and growth-promoting effect of mud carp (*Cirrhinus molitorella*) insulin-like growth factor-I [J]. Genl Comp Endocrinol, 2006, 148 (2): 203-212.
- [8] BIGA P R, PETERSON B C, SCHELLING G. T, et al. Bovine growth hormone treatment increased IGF- I in circulation and induced the production of a specific immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Aquac, 2005, 246 (1/4): 437-445.
- [9] SHINGO Kajimura, KATSUHISA Uchida, TAKASHI Yada, et al. Effects of insulin-like growth factors (IGF- I and -II) on growth hormone and prolactin release and gene expression in euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus* [J]. Genl Comp Endocrinol, 2002, 127 (3): 223-231.
- [10] PEREZ-SANCHEZ J, WEIL C, LE-BAI P Y. Effects of human insulin-like growth hormone factor- I on release of growth hormone by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pituitary cells [J]. Exp Zool, 1992, 262 (3): 287-290.
- [11] LEEDOM T A, UCHIDA K, YADA T, et al. Recombinant bovine growth hormone treatment of tilapia: growth response, meta-

- bolic clearance, receptor binding and immunoglobulin production [J]. *Aquac*, 2002, 207 (3/4): 359-380.
- [12] BICA P R, SCHELLING G T, HARDY R W, et al. The effects of recombinant bovine somatotropin (rbST) on tissue IGF-I, IGF-I receptor, and GH mRNA levels in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Genl Comp Endocrinol*, 2004, 135 (3): 324-333.
- [13] MELAMED P, GUR G, ELIZUR A, et al. Differential effects of gonadotropin-releasing hormone, dopamine and somatostatin and their second messengers on the mRNA levels of gonadotropin II b subunit and growth hormone the teleost fish, tilapia [J]. *Neuroendocrinol*, 1996, 64 (4): 320-328.
- [14] RILEY L G, HIRANO T, GRAU E G. Rat ghrelin stimulates growth hormone and prolactin release in the tilapia, *Oreochromis mossambicus* [J]. *Zool Sci*, 2002, 19 (7): 797-800.
- [15] UNNIAPPAN S, PETER R E. In vitro and in vivo effects of ghrelin on luteinizing hormone and growth hormone release in goldfish [J]. *Am Physiol*, 2004, 286 (6): 1093-1101.

欢迎订阅 2007 年《水产学报》

《水产学报》是中国水产学会主办、上海水产大学承办的以水产科学技术为主的国家级学术刊物，创刊于 1964 年。主要刊载渔业资源、水产养殖与增殖、水产捕捞、水产品保鲜与综合利用、渔业水域环境保护、渔船、渔业机械与仪器以及水产基础研究的论文，简报和综述，并酌登学术动态和重要书刊的评价等。

本刊为双月刊，大 16 开，国内外公开发行。每期定价 25 元，全年定价 150 元（含邮费）。国内统一刊号：CN 31-1283/S；国际标准刊号：ISSN 1000-0615。国内邮发代号：4-297，国外发行代号：Q-387。读者可在当地邮局订阅，也可直接汇款至编辑部订阅。

编辑部地址：上海市军工路 334 号，上海水产大学 48 信箱，邮编：200090

联系电话和传真：021-65710232

E-mail：jfc@shfu.edu.cn 或 scxuebao@online.sh.cn