

# 半胱胺对斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)生长激素及其受体 mRNA 水平的影响\*

李 云 蔡生力

(上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

**提要** 以海水硬骨鱼类斜带石斑鱼为研究对象,通过投喂和腹腔注射半胱胺盐酸盐(CSH),研究半胱胺对斜带石斑鱼生长激素(GH)及其受体(GHR)mRNA 水平的影响,以初步揭示半胱胺促进斜带石斑鱼生长的作用机理。结果表明,长期投喂 CSH 可以显著提高斜带石斑鱼的相对体重增长率。投喂和腹腔注射不同剂量的 CSH 均能明显促进斜带石斑鱼脑垂体 GH mRNA 水平及肝脏 2 种 gGHR mRNA 水平,且促进效果与 CSH 浓度呈剂量依存关系。本研究还就 CSH 对斜带石斑鱼 2 种不同类型 GHR 作用的剂量效应和时间效应进行了初步探讨。通过注射不同剂量 CSH 发现,低剂量 CSH(20  $\mu\text{g/g}$  体重)只可以引起 gGHR2 mRNA 水平的显著提高。中剂量 CSH(50  $\mu\text{g/g}$  体重)可同时显著提高 gGHR1 和 gGHR2 mRNA 水平,但 gGHR2 水平明显高于 gGHR1 水平;通过单独注射 50  $\mu\text{g/g}$  体重 CSH 溶液发现,注射后 2h,2 种 gGHR mRNA 水平均有显著升高,其中 gGHR2 水平明显高于 gGHR1。注射后 6h, gGHR2 mRNA 水平率先达到最高值。注射后 12h, gGHR1 mRNA 水平达到最大值。由此可以推测 gGHR2 对于 CSH 所引起刺激的剂量敏感性及时间敏感性均高于 gGHR1。

**关键词** 斜带石斑鱼, 生长, 生长激素, 生长激素受体, 半胱胺

**中图分类号** Q95

鱼类生长和生长激素(Growth hormone, GH)分泌活动的调控是通过下丘脑刺激性和抑制性因子的双重作用来实现的。实验证明促生长激素释放因子(Growth hormone-releasing factor, GRF)是鱼类 GH 释放的主要刺激性因子。合成的鲤鱼 GRF(cGRF)能使离体金鱼脑垂体碎片释放 GH,而注射 cGRF 也使金鱼血液中 GH 含量明显增加(Vanhan *et al.*, 1992)。从鲤鱼下丘脑已分离并鉴定出生长激素释放激素(Growth hormone-releasing hormone, GHRH),该肽具有促进金鱼和虹鳟脑垂体分泌 GH 的活性(Luo *et al.*, 1989; Vanhan *et al.*, 1992);除此之外,一些神经肽类或神经递质,如:神经肽 Y(Neuropeptide Y, NPY),促性腺激素释放激素(Gonadotropin-releasing hormone, GnRH),多巴胺(Dopamine, DA)等,均可以直接或间

接促进鱼类的 GH 分泌(Peng *et al.*, 1993a, b; 王黎等, 1997; 林信伟等, 1994; 刘峰等, 2009; 马细兰等, 2009)。

在鱼类,已有许多种类的 GHR cDNA 相继被克隆。例如:金鱼(*Carassius auratus*) (Lee *et al.*, 2001)、大菱鲂(*Scophthalmus maximus*) (Calduch-Giner *et al.*, 2001)、日本鳗鲡(*Anguilla japonica*) (Ozaki *et al.*, 2002)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) (Very *et al.*, 2005)等。近年来,随着 2 种不同类型的 GHR 在同一种硬骨鱼类中发现(Jiao *et al.*, 2006; Saera-Vila *et al.*, 2005),人们越来越意识到第二种 GHR 类型的存在,但关于两种不同类型 GHR 之间的生理功能差异还鲜有报道。

本文以重要海水经济鱼类斜带石斑鱼(Orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*)为研究对象,初

\* 上海市教委重点学科项目(海洋生物学), J50701 号; 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金, B-8101-08-0012 号。

李 云, 博士, 讲师, E-mail: liyun@shou.edu.cn

通讯作者: 蔡生力, 教授, E-mail: slcai@shou.edu.cn

收稿日期: 2009-10-12, 收修改稿日期: 2009-12-20

步研究了 CSH 对斜带石斑鱼生长激素及其受体 mRNA 水平的影响以及作用机理; 建立了斜带石斑鱼 GH 及 2 种 GHR 基因的 Real-time PCR 定量检测方法, 为从分子水平研究斜带石斑鱼的生长规律与内分泌调控打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验所用斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)购自上海铜川路水产市场。投喂实验用鱼平均体重为  $(45.16 \pm 3.16)$ g, 平均体长为  $(14.16 \pm 0.62)$ cm; 注射实验用鱼平均体重为  $(157.13 \pm 6.07)$ g, 平均体长为  $(18.16 \pm 1.27)$ cm。选取体格健壮, 规格大致相同的斜带石斑鱼分养于多个水族缸里。自然光照和水温, 24h 保持人工通气和循环过滤海水。驯养期间投喂基础饲料。每天投喂两次(8:00 和 16:00), 每天的投喂量约为鱼体重的 5%(具体情况视天气和鱼类摄食情况而定)。驯养为期 2 周。

半胱胺盐酸盐(Cysteamine hydrochloride, CSH)购自上海瑞芳德化工有限公司; 总 RNA 提取试剂 TRIzol<sup>®</sup> reagent 购自美国 Invitrogen 公司; 反转录试剂盒 TOYOBO ReverTra Ace-a<sup>™</sup> Kit, Real-time PCR 试剂盒 SYBR<sup>®</sup>Green Realtime PCR Master Mix 购自日本 TOYOBO 公司; PCR 引物由上海生工生物技术公司合成; 其余均为国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

**1.2.1 CSH 拌料投喂对斜带石斑鱼相对体重增长率 GH mRNA 及两种 GHR mRNA 水平的影响** 驯养结束以后, 实验用鱼分养于 4 个水族缸里, 每缸 50 尾, 并开始进行投喂实验, 实验为期 4 周。自然光照和水温, 24h 通气和循环过滤水质。不同实验组按实验设计投喂含有不同剂量半胱胺盐酸盐(CSH)的饲料(表 1), 对照组投喂对照饲料(即不添加 CSH 的基础饲料), 每天投喂两次(8:00 和 16:00), 每天的投喂量约为

表 1 CSH 拌料投喂实验分组情况

Tab.1 Experimental design of administration of CSH at different doses in diet

| 实验分组 | 药物  | 剂量(mg/g 饲料) |
|------|-----|-------------|
| A 组  | PS  | —           |
| B 组  | CSH | 0.4         |
| C 组  | CSH | 0.6         |
| D 组  | CSH | 1.0         |

注: PS 为生理盐水(Physiological Saline), 下同

鱼体重的 5%(具体情况视天气和鱼类摄食情况而定)。最后一次投喂的次日早上 8:00 测体长和称体重, 取脑垂体及肝脏样品, 于液氮中保存带回实验室, 存放于 -80 低温冰箱以备之后分子生物学实验。

**1.2.2 CSH 对斜带石斑鱼 GH mRNA 及两种 GHR mRNA 作用的时间效应研究** 驯养结束后于最后一次投喂后的次日早上 8:00 开始进行正式注射实验。将实验鱼随机分为 A—E 共 5 组, 每组 15 尾。用生理盐水将 CSH 稀释不同浓度的溶液后进行腹腔注射(表 2)。其中 A 组注射生理盐水, 其它各组按  $50\mu\text{g/g}$  体重剂量进行注射。A—E 组依次于注射后 0h、2h、6h、12h、24h 取脑垂体及肝脏样品, 于液氮中保存带回实验室, 存放于 -80 低温冰箱以备之后分子生物学实验。

**1.2.3 CSH 对斜带石斑鱼 GH mRNA 及两种 GHR mRNA 作用的剂量效应研究** 驯养结束后于最后一次投喂后的次日早上 8:00 开始进行正式注射实验。用生理盐水将半胱胺盐酸盐(CSH)按不同的浓度稀释。将实验鱼随机分为 4 组, 每组 15 尾, 不同实验组按实验设计用 1ml 注射器腹腔注射不同剂量 CSH 溶液(表 3), 对照组注射生理盐水。于注射后 2h 取垂体以及肝脏样品, 于液氮中保存, 带回实验室, 存放于 -80 低温冰箱以备后面的分子生物学实验。

表 2 CSH 腹腔注射实时间效应实验分组情况  
Tab.2 Injection schedule of a single dose of CSH

| 实验分组 | 药物                         | 注射后时间(h) |
|------|----------------------------|----------|
| A 组  | PS                         | 0        |
| B 组  | CSH( $50\mu\text{g/g}$ 体重) | 2        |
| C 组  | CSH( $50\mu\text{g/g}$ 体重) | 6        |
| D 组  | CSH( $50\mu\text{g/g}$ 体重) | 12       |
| E 组  | CSH( $50\mu\text{g/g}$ 体重) | 24       |

表 3 不同剂量 CSH 腹腔注射实验分组情况  
Tab.3 Experimental design of injection of different doses of CSH

| 实验分组 | 药物  | 剂量( $\mu\text{g/g}$ 体重) |
|------|-----|-------------------------|
| A 组  | PS  | —                       |
| B 组  | CSH | 20                      |
| C 组  | CSH | 50                      |
| D 组  | CSH | 100                     |

**1.2.4 总 RNA 的提取** 将在液氮中冻存的组织样品取出, 匀浆后, 按照 TRIzol<sup>®</sup> reagent 试剂盒操作说明提取总 RNA。采用核酸蛋白测定仪测定所提 RNA 样品的  $OD_{260}$ 、 $OD_{280}$  值, 以确定 RNA 的浓度, 并用

$OD_{260}/OD_{280}$  的比值判断其纯度。0.8%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。

**1.2.5 反转录及引物设计** 按照 TOYOBO Re-  
verTra Ace-a-<sup>TM</sup> Kit 试剂盒操作说明, 将之前所提取的总 RNA 反转录获得 cDNA。反转录产物于 -20 保存备用。根据已报道的斜带石斑鱼生长激素基因, 两种生长激素受体基因和  $\beta$ -actin 基因的序列(NCBI GenBank 序列号码分别为 AY038606、AY510710、EF052273、EF052274), 设计特异性引物(表 4)。

表 4 Real-time PCR 检测所用引物序列  
Tab.4 Nucleotide sequences of the primers used for real-time PCR

| 引物               | 序列                                |
|------------------|-----------------------------------|
| GH-Real-F        | 5' AGA CGG AGG AGC AGC GAC AG 3'  |
| GH-Real-R        | 5' TCC CAG GAC TCC ACC AAC C 3'   |
| GHR1-Real-F      | 5' GCG ACT CCA TCT TCA TTC A 3'   |
| GHR1-Real-R      | 5' GCA TCC TCA GCA TCC ACC 3'     |
| GHR2-Real-F      | 5' GAC GCT GCT GAA TGT GA 3'      |
| GHR2-Real-R      | 5' ACC CGA ACC TCG TGA ATG 3'     |
| $\beta$ -Actin-F | 5' GGT GGG TAT GGG TCA GAA AGA 3' |
| $\beta$ -Actin-R | 5' GAT GAG GAA GTG CTG TCG 3'     |

### 1.2.6 Real-time PCR 标准曲线的准备及样品测定

以斜带石斑鱼肝脏、脑垂体总 RNA 为模板进行反转录, 以 Real-time PCR 特异性引物为引物, PCR 扩增获得斜带石斑鱼 GH 基因, 2 种 gGHR 基因和  $\beta$ -actin 基因的片段。PCR 产物经 1.5%琼脂糖电泳, 按照 e.Z.N.A<sup>®</sup> Gel Extraction Kit 的操作说明对 PCR 扩增片段进行纯化、回收。按照 InsT/Aclone<sup>TM</sup> PCR Product Cloning Kit 载体连接试剂盒的操作说明将纯化产物与 pGEM R-T 载体在 T<sub>4</sub> DNA 连接酶作用下进行连接反应, 构建扩增产物的重组质粒。转化 DH<sub>5</sub> 感受态细胞, 涂于 Amp、X-Gal 和 IPTG 处理的 LB 琼脂平板上, 37 过夜培养, 挑取单个白色菌落, 在 Amp+/LB 液体培养基中 37、200r/min 过夜, 按照参照质粒快速提取试剂盒 E.Z.N.A<sup>®</sup> Plasmid Extraction Kit 操作要求提取质粒, 对所得重组质粒分别进行 PCR 鉴定。采用核酸蛋白测定仪测定所提质粒样品的浓度, 并将含有被测基因的片段的质粒按 10—10<sup>9</sup> 梯度稀释, -20 保存以备用于建立 Real-time PCR 标准曲线。

使用 ABI PRISM<sup>®</sup> 7900 Sequence Detection System 仪器, 参照 SYBR<sup>®</sup>Green Realtime PCR Master Mix 试剂盒说明对实验各组样品的  $\beta$ -actin、GH、

GHR1、GHR2 基因 cDNA 进行定量测定。ABI PRISM<sup>®</sup> 7900 Sequence Detection System 的具体反应程序设计为: 95 预变性 60s, 95 变性 15s, 58 退火 15s, 72 延伸 30s, 共 40 个循环。最后进行融解曲线分析, 以确定 PCR 产物质量。

**1.2.7 数据统计与分析** 相对体重增长率计算方法: 相对体重增长率 = (平均每尾终末体重 - 平均每尾初始体重) / 平均每尾初始体重  $\times$  100%;

Real-time PCR 分析: 以含有目的基因片段的质粒浓度梯度所对应的 C<sub>T</sub> 值(阈值循环数, Threshold Cycle)为纵坐标, 以稀释倍数的对数值为横坐标, 制作目的基因的标准曲线。

将各组样品所测基因的 C<sub>T</sub> 值与相对应的标准曲线相比照, 即可得到该样品所测基因表达量的相对浓度值。最后采用目的基因与内参基因  $\beta$ -actin 的比值来表示目的基因的相对定量结果(RCGHR/RC  $\beta$ -actin)。所有数据采用平均值  $\pm$  标准差(means  $\pm$  SD)表示。采用 SPSS 13.0 统计软件来分析数据, 用 Duncan's multiple range test 来检验统计差异, 当  $P < 0.05$  认为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 单独投喂 CSH 对斜带石斑鱼相对体重增长率水平的影响

在 0.4、0.6、1.0mg/g 饲料三种不同剂量的 CSH 长期作用下, 斜带石斑鱼的相对体重增长率(65.87%  $\pm$  6.45%、68.34%  $\pm$  2.13%、85.52%  $\pm$  6.65%,  $n=50$ )均高于对照组水平(57.31%  $\pm$  2.23%,  $n=50$ )。其中, 1.0mg/g 饲料组的斜带石斑鱼相对体重增长率显著高于其它各组( $P < 0.05$ ); 而 0.4mg/g 饲料组和 0.6mg/g 饲料组的相对体重增长率虽然高于对照组, 但各组间差异不显著。

### 2.2 单独投喂 CSH 对斜带石斑鱼 GH mRNA 及两种 GHR mRNA 水平的影响

通过 Real-time PCR 检测发现, 不同剂量的 CSH 均能显著提高斜带石斑鱼的垂体 GH mRNA 水平, 而且随着 CSH 添加剂量的增加, GH mRNA 水平逐渐提高, 存在一种剂量依存效应(图 1)。其中, 1.0mg/g 饲料组的石斑鱼的垂体 GH mRNA 水平显著高于其它各投药组和对照组( $P < 0.05$ )。

同时, 不同剂量的 CSH 还可以提高斜带石斑鱼肝脏 2 种 GHR mRNA 水平。而且随着 CSH 添加剂量的增加, 斜带石斑鱼肝脏 2 种 GHR mRNA 水平逐渐提高, 且存在剂量依存关系(图 1)。当 CSH 剂量达到

1mg/g 饲料时, 斜带石斑鱼肝脏 2 种 GHR mRNA 水平均到达最高, 且显著高于其它各组( $P<0.05$ )。

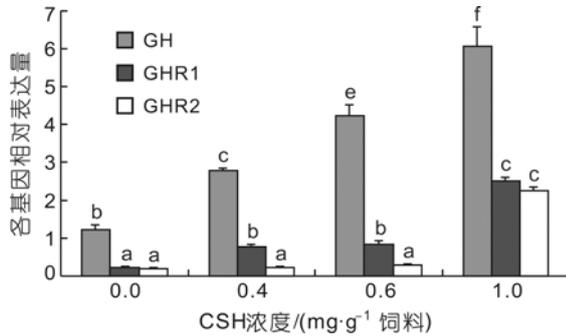


图 1 不同浓度的 CSH 单独投喂对斜带石斑鱼 GH mRNA 及两种 GHR mRNA 水平的影响

Fig.1 Effects of various concentrations of CSH in diet on levels of GH mRNA and two types of GHR mRNA in orange-spotted grouper  
注: 所有数据均采用平均值±标准差来表示( $n=15$ )。不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )

### 2.3 腹腔注射 CSH 后斜带石斑鱼 GH mRNA 及两种 GHR mRNA 水平的变化

采用 Real-time PCR 技术对实验各组脑垂体样品的 GH mRNA 水平进行了测定, 结果如图 2 所示, 腹腔注射 50 $\mu$ g/g 体重的 CSH 溶液 2h 后斜带石斑鱼垂体 GH mRNA 水平明显升高。注射 CSH 后 6h, 垂体 GH mRNA 水平明显高于注射后 2h 水平( $P<0.05$ )。注射 CSH 后 12h, 垂体 GH mRNA 水平达到最大值, 但与注射后 6h 水平间差异不显著。注射 CSH 后 24h, 斜带石斑鱼垂体 GH mRNA 水平恢复至注射前水平。

如图 2 所示, 注射药物前, 斜带石斑鱼肝脏 2 种 gGHR mRNA 水平间无显著差异( $P>0.05$ )。在腹腔注

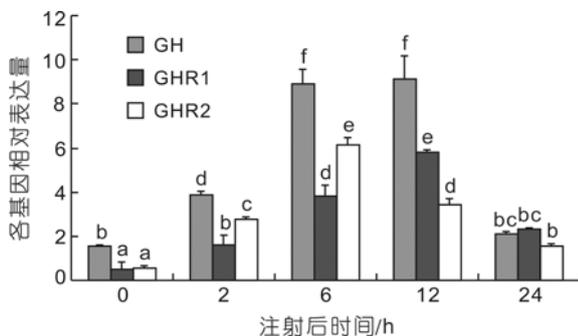


图 2 腹腔注射 CSH 后斜带石斑鱼 GH mRNA 及两种 GHR mRNA 水平的变化

Fig.2 Changes of GH and GHRs mRNA levels after injection of CSH at different time in orange-spotted grouper  
注: 所有数据均采用平均值±标准差表示( $n=15$ )。不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )

射 50 $\mu$ g/g 体重的 CSH 溶液 2h 后, 斜带石斑鱼肝脏 2 种 gGHR mRNA 水平相对注射前均有显著升高, 其中 gGHR2 mRNA 水平明显高于 gGHR1 mRNA 水平( $P<0.05$ )。注射 CSH 6h 后, 斜带石斑鱼肝脏 2 种 gGHR mRNA 水平继续升高, 其中 gGHR2 mRNA 水平达到最高, 且明显高于 gGHR1 mRNA 水平( $P<0.05$ )。注射 12h 后, 斜带石斑鱼肝脏 gGHR2 mRNA 水平有明显下降, 而 gGHR1 mRNA 水平继续升高达到峰值, 此时 gGHR1 mRNA 水平明显高于 gGHR2 mRNA( $P<0.05$ )。在注射 CSH 24h 后, 2 种 gGHR mRNA 水平均有显著下降, 但仍明显高于注射前水平( $P<0.05$ ), 且 2 种 gGHR mRNA 水平之间差异不显著。

### 2.4 腹腔注射不同剂量 CSH 对斜带石斑鱼 GH mRNA 及两种 GHR mRNA 水平的影响

实验结果如图 3 所示, 腹腔注射不同剂量的 CSH 溶液均可以引起斜带石斑鱼脑垂体 GH mRNA 水平的显著升高( $P<0.05$ )。同时, 随着 CSH 注射剂量的升高, 斜带石斑鱼垂体 GH mRNA 水平也不断显著升高, 呈现一个剂量依存的关系。

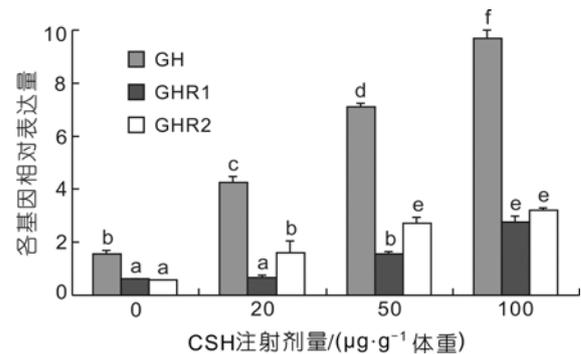


图 3 腹腔注射不同剂量 CSH 对斜带石斑鱼 GH mRNA 及两种 GHR mRNA 水平的影响

Fig.3 Changes of GH and GHRs mRNA levels after injection of different doses of CSH in orange-spotted grouper  
注: 所有数据均采用平均值±标准差表示( $n=15$ )。不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )

同时, 还采用 Real-time PCR 技术对实验各组肝脏样品 2 种不同类型的 gGHR mRNA 水平进行了测定。结果发现, 腹腔注射不同剂量的 CSH 溶液 2h 后均能引起斜带石斑鱼肝脏 2 种类型的 gGHR mRNA 水平的升高, 其中 gGHR2 mRNA 水平均高于 gGHR1 mRNA 水平。如图 3 所示, 随着 CSH 剂量的提高, 2 种 gGHR mRNA 水平逐渐升高。其中, 当 CSH 剂量为 20 $\mu$ g/g 体重时, gGHR2 mRNA 水平相对于对照组有明显提高( $P<0.05$ ), 而 gGHR1 mRNA 水平虽然有

升高,但相对于对照组差异不显著( $P>0.05$ )。当 CSH 注射剂量为  $50\mu\text{g/g}$  体重时,2 种 gGHR mRNA 水平相比对照组及  $20\mu\text{g/g}$  体重剂量组均有显著提高( $P<0.05$ )。当注射剂量为  $100\mu\text{g/g}$  体重时,2 种 gGHR mRNA 水平均达到最高值,其中 gGHR1 mRNA 水平明显高于其余各组( $P<0.05$ ),且 2 种 gGHR mRNA 水平之间差异不显著( $P>0.05$ )。

### 3 讨论

荧光实时定量 PCR(real-time PCR)作为对基因表达的一种极其有效的检测方法,已被广泛地应用于分子生物学的各个领域。较之以前的免疫组织化学、原位杂交或 RT-PCR 半定量法,Real-time RT-PCR 技术具备以下优点:灵敏度高;实现真正意义上的定量检测基因的表达;减少有毒污染,可以实现高通量;所有实验在封闭系统内完成,可变因素大大减少;可以进行多重 PCR 反应,而且不需要后期处理,数据的测定和处理一步到位(Tichopad *et al.*, 2003)。本研究首次建立了斜带石斑鱼 GH 及 2 种 GHR 基因的 Real-time PCR 定量检测方法,为从分子水平研究斜带石斑鱼的生长规律与内分泌调控打下基础。

本研究发现,投喂和腹腔注射不同剂量的 CSH 均能引起斜带石斑鱼垂体 GH mRNA 水平的显著提高,且 CSH 作用呈剂量依存关系,随着 CSH 剂量的不断增加,斜带石斑鱼脑垂体的 GH mRNA 水平不断提高,这与 Xiao 等(2003)在草鱼、石和荣等(2005)在黄鳍鲷的研究成果相一致。具有巯基和氨基等活性基团的 CSH 可以破坏 SRIF 分子构型中的二硫键,使其免疫和生物活性丧失,从而解除对生长激素的抑制作用,以提高血液中 GH 的水平(Nelson *et al.*, 2005; Hall *et al.*, 1986)。但在对绵羊(McLeod *et al.*, 1995)、大鼠(Millard *et al.*, 1983)的研究报道中表明,CSH 对血液 GH 浓度的影响与施用剂量有关,低剂量的 CSH 可以增加血液中 GH 的水平,而高剂量则会降低血液中 GH 的水平。低剂量的 CSH 被认为是通过抑制 SRIF 的抑制作用从而提高血液中 GH 的释放,而高剂量的 CSH 在抑制 SRIF 作用的同时也影响了生长激素释放因子(growth hormone-releasing factor, GRF)的释放,这两种影响相互作用导致了血液中 GH 的水平下降。因此可以推测 CSH 对动物生长激素转录和分泌水平的作用是一个多种因子共同参与的过程。其影响可能由于动物种类、给药剂量等方面的差异而不同,具体机制还有待进一步研究。

本实验首次就 CSH 对于硬骨鱼类 2 种不同类型的生长激素受体的作用进行了研究。投喂不同剂量的 CSH 均能显著提高 2 种斜带石斑鱼 GHR mRNA 水平,且存在一个剂量依存关系。这一结果同之前实验中的斜带石斑鱼 GH mRNA 水平变化结果相吻合,同时结合 CSH 投喂对斜带石斑鱼相对体重增长率的影响结果,可以推测:CSH 调控斜带石斑鱼生长,首先通过抑制 SRIF 的作用,可以显著提高斜带石斑鱼幼鱼 GH 水平,且存在一个剂量依存关系。而一定生理浓度范围内的 GH 水平可以对肝脏 GHR 起着上调(up-regulation)(Mullis *et al.*, 1991, 1999)的作用。随着 GH 和 gGHR 水平的双重上升,GH 不断同 gGHR 相结合,从而启动下游信号传导,最终导致斜带石斑鱼生长水平的提高。因此,半胱胺作为一种有效的促生长剂运用于海水经济鱼类的人工养殖,尤其是斜带石斑鱼的人工养殖方面的前景是十分广阔的。

本研究还就 CSH 对斜带石斑鱼 2 种 GHR 作用的剂量效应和时间效应进行了初步的探讨。首先,采用不同剂量的 CSH 对斜带石斑鱼进行腹腔注射,在注射后 2h 对 2 种 gGHR mRNA 水平进行测定,发现注射低剂量 CSH( $20\mu\text{g/g}$  体重)可以引起 gGHR2 mRNA 水平的显著提高,但不能引起 gGHR1 mRNA 水平的显著提高。当采用中等剂量的 CSH( $50\mu\text{g/g}$  体重)注射鱼体时,可同时显著提高 gGHR1 mRNA 和 gGHR2 mRNA 水平,但 gGHR2 mRNA 水平仍明显高于 gGHR1 mRNA 水平,由此作者推测在对不同剂量的 CSH 所引起的刺激的敏感性上,gGHR2 要明显高于 gGHR1。同时通过注射适当剂量 CSH 后,对不同时间内 2 种 gGHR mRNA 水平变化的研究发现,在注射适当剂量 CSH 后的早期(2h),gGHR2 mRNA 水平就产生明显的提升,而且在注射后 6h 就达到峰值(相对于注射前水平,gGHR1 mRNA 水平在注射后 2h 变化不明显,注射后 6h 升高显著,注射后 12h 达到峰值),随后迅速下降。由此可见在对于 CSH 所引起的刺激的反应时间上 gGHR2 也明显快于 gGHR1。综合以上两点可以推测,在对 CSH 所引起的刺激的敏感性上 gGHR2 要明显高于 gGHR1。CSH 通过抑制 SRIF 作用,从而提高 GH 水平。血清中增高的 GH 水平可以导致肝脏 GHR 基因表达的一个上调(Mullis *et al.*, 1999)。GH 通过同肝脏靶位点上的 GHR 结合从而启动下游信号的转导,最终实现促进生长。所以 gGHR2 对 CSH 所引起的刺激敏感,实际上是对 CSH 刺激的 GH 所引起的上调作用敏感。所以作者猜测这种不同类型受体

对于配体的上调调控作用的敏感差异可能是由于不同类型受体同配体间结合力的差异所引起。有关鱼类 2 种不同类型的 GHR 与 GH 之间结合力的差异的研究至今尚未见报道。但根据关于斜带石斑鱼 2 种 gGHR 分子结构的报道(Li *et al*, 2007)得知, gGHR1 在胞外区半胱氨酸残基数目上要比 gGHR2 多, 这就有可能形成更多的二硫键参与配体的结合, 导致与配体结合力更强。同时, gGHR1 胞内区的酪氨酸残基数目也要多于 gGHR2。而这些酪氨酸残基可以为信号分子在磷酸化以后提供必要的锚定位点(Hansen *et al*, 1997; Herrington *et al*, 2000; Wang *et al*, 1996; 鲁双庆等, 2008), 因此推测 gGHR1 在下游信号传导方面的效率也要高于 gGHR2。Jiao 等(2006)在同为鲈形目的黑鲷中的研究也指出, GHR1 在下游信号传导方面的效率要高于 GHR2。同时, Zhang 等(2000)关于两种类型雌激素受体的研究中指出同一种类的受体可以调节该种类不同类型的相关受体。所以作者推测在由 CSH 所引起的斜带石斑鱼生长调控过程, gGHR1 由于较高的转导效率而在信号转导方面起主导作用, 而 gGHR2 通过与配体的竞争结合从而调控 gGHR1 的生理功能, 最后在两种 gGHR 的共同作用下完成一系列生理功能。当然, 关于硬骨鱼类 2 种不同类型 GHR 的具体生理功能差异还有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- 马细兰, 张 勇, 刘 云等, 2009. 不同饥饿时段对黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*) ghrelin 基因表达的影响. 海洋与湖沼, 40(3): 313—318
- 王 黎, 林浩然, 张为民, 1997. 不同的下丘脑肽和神经递质对鲤鱼促性腺激素和生长激素分泌活动的影响. 动物学研究, 18(1): 79—84
- 石和荣, 张为民, 刘晓春等, 2005. 半胱胺盐酸盐和 LHRH-A 对黄鳍鲷生长激素分泌的影响. 海洋学报, 27(3): 147—153
- 刘 峰, 鲁双庆, 刘 臻等, 2009. 三种鳊鱼(*Siniperca*)生长激素基因内含子多态性的比较研究. 海洋与湖沼, 40(4): 470—478
- 林信伟, 林浩然, 1994. 鲑鱼促性腺激素释放激素(sGnRH)调节鲤鱼脑垂体生长激素分泌的离体研究. 动物学报, 40(1): 30—38
- 鲁双庆, 刘 峰, 刘 臻等, 2008. 三种鳊鱼(*Siniperca*)生长激素基因的克隆及序列比较. 海洋与湖沼, 39(4): 354—361
- Calduch-Giner J A, Duval H, Chesnel F *et al*, 2001. Fish growth hormone receptor: molecular characterization of two membrane-anchored forms. Endocrinology, 142: 3269—3273
- Hall T R, Harvey S, Scanes C G, 1986. Control of growth hormone secretion in the vertebrates, a comparative survey. Comp Biochem Physiol, 84: 231—253
- Hansen J A, Hansen L H, Wang X *et al*, 1997. The role of GH receptor tyrosine phosphorylation in Stat5 activation. J Mol Endocrinol, 18: 213—221
- Herrington J R, Miller J A, O'Neill S *et al*, 2000. The role of STAT proteins in growth hormone signaling. Oncogene, 19: 585—2597
- Jiao B W, Huang X G, Chan C B *et al*, 2006. The co-existence of two growth hormone receptors in teleost and their differential signal transduction, tissue distribution and hormone regulation of expression in seabream. J Mol Endocrinol, 36: 23—40
- Lee L T O, Nong G, Tse D L Y *et al*, 2001. Molecular cloning of a teleost growth hormone receptor and its functional interaction with human growth hormone. Gene, 270: 121—129
- Li Y, Liu X C, Zhu P *et al*, 2007. Molecular cloning, characterization and distribution of two types of growth hormone receptor in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). Gen Comp Endocrinol, 152: 111—122
- Luo D, McKeown B A, 1989. An antioxidant dependent *in vitro* response of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, somatotrophs to carp growth hormone-releasing factor (GRF). Horm Metab Res, 21: 690—692
- McLeod K R, Harmon D L, Schillo K K *et al*, 1995. Effects of cysteamine on pulsatile growth hormone release and plasma insulin concentrations in sheep. Comp Biochem Physiol B, 112: 523—533
- Millard W J, Sagar S M, Badger T M *et al*, 1983. Cysteamine effects on growth hormone secretion in the male rat. Endocrinology, 112: 509—517
- Mullis P E, Eble A, Marti U *et al*, 1999. Regulation of human growth hormone receptor gene transcription by triiodothyronine (T<sub>3</sub>). Mol Cell Endocrinol, 147: 17—25
- Mullis P E, Lund T, Patel M S *et al*, 1991. Regulation of human growth hormone receptor gene expression by human growth hormone in a human hepatoma cell line. Mol Cell Endocrinol, 76: 125—133
- Nelson L E, Sheridan M A, 2005. Regulation of somatostatins and their receptors in fish. Gen Comp Endocrinol, 142: 117—133
- Ozaki Y, Fukada H, Kazeto Y *et al*, 2002. Isolation of two types of cDNA encoding growth hormone receptor like gene in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. In: Proceedings of International Commemorative Symposium, 70<sup>th</sup> Anniversary of the Japanese Society of Fisheries Science, 68: 959—960
- Peng C, Chang J P, Yu K L *et al*, 1993a. Neuropeptide-Y stimulates growth hormone and gonadotropin secretion in the goldfish pituitary: Involvement of both presynaptic and pituitary cell actions. Endocrinology, 132: 1820—1829
- Peng C, Humphries S, Peter R E *et al*, 1993b. Actions of goldfish

- neuropeptide Y on the secretion of growth hormone and gonadotropin- in female goldfish. *Gen Comp Endocrinol*, 90: 306—317
- Saera-Vila A, Caldach-Giner J P, Perez-Sanchez J, 2005. Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Gen Comp Endocrinol*, 142: 193—203
- Tichopad A, Pfaffl MW, Didier A, 2003. Tissue-specific expression pattern of bovine prion gene: quantification using real-time RT-PCR. *Mol Cell Probes*, 17: 5—10
- Vanghan J M, Rivier J, Spiess J *et al*, 1992. Isolation and characterization of hypothalamic growth hormone-releasing factor from common carp, *Cyprinus carpio*. *Neuroendocrinology*, 56: 539—549
- Very N M, Kittilson J D, Norbeck L A *et al*, 2005. Isolation, characterization, and distribution of two cDNAs encoding for growth hormone receptor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol B*, 140: 615—628
- Wang X, Darus C J, Xu B C *et al*, 1996. Identification of growth hormone receptor (GHR) tyrosine residues required for GHR phosphorylation and JAK2 and STAT5 activation. *Mol Endocrinol*, 10: 1249—1260
- Xiao D, Lin H R, 2003. Cysteamine—a somatostatin-inhibiting agent-induced growth hormone secretion and growth acceleration in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Gen Comp Endocrinol*, 134: 285—295
- Zhang W, Saji S, Makinen S *et al*, 2000. Estrogen receptor (ER)  $\beta$ , a modulator of ER in the uterus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 5936—5941

## EFFECTS OF CYSTEAMINE ON mRNA LEVELS OF GROWTH HORMONE AND ITS RECEPTORS IN ORANGE-SPOTTED GROUPER *EPINEPHELUS COIODES*

LI Yun, CAI Sheng-Li

(College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306)

**Abstract** In present research, we found that cysteamine hydrochloride (CSH) administrated in diet could significantly enhance growth of orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*. Both CSH administrated through diet and injection could enhance the levels of growth hormone (GH) mRNA and two types of growth hormone receptors (GHR) mRNA in orange-spotted grouper in a dose-dependent manner. In addition, changes of the levels of two GHRs mRNA induced by the injection of CSH at different doses/hours were investigated. Injection of CSH at 20  $\mu\text{g/g}$  b.w. could only enhance gGHR2 mRNA level significantly; in contrast the medium dose of CSH (50 $\mu\text{g/g}$  b.w.) could significantly enhance two types of GHR mRNA levels. Furthermore, two hours after injection of CSH at 50 $\mu\text{g/g}$  b.w., the levels of two GHR mRNA were increased significantly and gGHR2 mRNA level was much higher than that of gGHR1. gGHR2 mRNA level reached maximum 6 hours after injection, while gGHR1 got to the peak value 12 hours after injection. So, gGHR2 seemed more sensitive to the stimulation induced by the injection of CSH.

**Key words** Orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*, Growth, Growth hormone, Growth hormone receptor, Cysteamine